Die Regulation der Gametogenese von Chlamydomonas eugametos und Chlamydomonas moewusii durch exogene und endogene Faktoren. Vergleichend morphologische, physiologische und biophysikalische Untersuchungen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
KARL MAX HARTMANN
aus Berlin

7260

1962

Die Regulation der Gametogenese von Chlamydomonas eugametos und Chlamydomonas moewusii durch exogene und endogene Faktoren. Vergleichend morphologische, physiologische und biophysikalische Untersuchungen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der
Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
KARL MAX HARTMANN
aus Berlin

1962

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1962

Dekan: Prof. Dr. K. Grell

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bünning
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Weidel

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 8
II. Material und Anzucht 10
1. Material 10
2. Anzucht 11
III. Grundmethoden 12
1. Auslösung der Geißelbildung und der Sexualität 12
2. Dunkelkammerbeleuchtung 12
3. Der Agglutinationstest 13
4. Bestimmung des Zellvolumens 14
5. Der Paarungstest 14
a) Versuchsbedingungen 14
b) Die Paarung 14
c) Die Auswertung 15
d) Dunkelgametentiter und potentieller Gametentiter 15
e) Auswertungs- und Versuchsfehler 16
f) Prüfung auf Signifikanz 18
g) Die Bedeutung des Tests 18
6. Die elektronenoptische Präparation 18
7. Die pH-Messung 19
8. Chemikalien 19
9. Zellzeit 19
IV. Einige Befunde zur Physiologie und Morphologie der Zelle als Funktion des Kulturalters 19
1. Sexuelle Aktivität 19
2. Zellgröße 20
3. Reservestoffe 20
V. Die pH-Abhängigkeit der Agglutination und Paarung 21
a) Methodik 21
b) Ergebnisse 21
VI. Die Suspendierlösung zur Auslösung der Sexualität 22
a) Problematik 22
b) Ergebnisse 23

VII. Die Proportionalität des Paarungstestes 24
VIII. Die Regulation der sexuellen Aktivität durch Ammoniumionen 24
a) Methodik 24
b) Ergebnisse 26
1. Der Einfluß von Ammoniumionen auf die Paarungsrate und Agglutination 26
2. Spezifische Hemmung der Agglutination durch Blausäure 27
3. Der Einfluß von Ammoniumionen auf die Atmung 27
4. Die Ammoniumassimilation 28
IX. Diskussion der Ergebnisse aus IV. mit IX. 28
X. Zur Dynamik der sexuellen Aktivierung 32
1. Dosis-Effekt-Kurven der sexuellen Aktivierung 32
a) Methodik 32
b) Ergebnisse 32
2. Der Abbau der sexuellen Aktivität 34
a) Methodik 35
b) Ergebnisse 35
3. Das Synthesegleichgewicht 38
4. Zur Frage der Gültigkeit des Reizmengengesetzes 41
XI. Endodiurnal gesteuerte Schwankungen der sexuellen Aktivität 42
1. Die Entdeckung der endogenen Rhythmik und ihr Temperaturkoeffizient 42
2. Der Einfluß des Suspendierzeitpunktes auf die Phasenlage der Rhythmik 45
3. Der Einfluß kurzzeitiger Kältebehandlungen auf die Phasenlage der Rhythmik 45
4. Das rhythmische Verhalten von Dauerlichtkulturen und Versuche zur Auslösung der Rhythmik 46
5. Das rhythmische Verhalten der Einzelzellen nach Dauerlichtkultur 48
6. Tagesperiodische Schwankungen der Lichtempfindlichkeit 48

7. Diskusssion der Ergebnisse aus XI. 49
XII. Das Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung und seine tagesperiodischen Schwankungen 53
1. Überlegungen zur Bestimmung der Wirkungsspektren 53
2. Vorversuche zum Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung 56
a) Methodik 56
b) Ergebnisse 57
3. DierInterferenzfilter-Monochromatoranlage für Versuche in manometrischer Anordnung ... 60
a) Die Strahlungsquellen 60
b) Die optische Anordnung 60
c) Die Filterkombinationen 62
d) Die Strahlungsmessung 63
e) Die Leistungsfähigkeit der Anlage 67
f) Die Absorptionsmessung mit der ULBRICHT'schen Kugel 68
g) Die Berechnung der mittleren Intensität in der Zellsuspension 69
h) Versuchsgefäße und Versuchsverlauf 71
4. Dosis-Effekt-Kurven 72
a) bei konstantem Quantenstrom und variierter Expositionszeit 72
b) bei konstanter Expositionszeit und variiertem Quantenstrom 74
5. Das Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung, bestimmt z. Zt. des diurnalen Aktivitätsmaximums und -minimums 78
a) Methodik 78
b) Ergebnisse 79
XIII. Die Niederenergiereaktion 81
1. Schwankungen der Dunkelrotempfindlichkeit .. 81
2. Hinweise für eine Phasenverschiebung der Rhythmik durch Störlicht 82
3. Dosis-Effekt-Kurven für den Einfluß von Störlicht aus die sexuelle Aktivität 83
a) bei variierter Expositionsdauer 83
b) bei variiertem Quantenstrom 84

4. Das Wirkungsspektrum der Hemmung der sexuellen Aktivität durch Störlicht 85
5. Die Steuerung der sexuellen Aktivität durch das reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem 87
a) Methodik 87
b) Ergebnisse 88
XIV. Die Hochenergiereaktion und das Adaptationsvermögen 91
XV. Die Interpretation der tagesperiodischen Änderungen des Wirkungsspektrums der sexuellen Aktivierung 94
XVI. Sauerstoffpartialdruck und sexuelle Aktivität .. 101
1. Versuche mit dem Agglutinationstest 101
a) Methodik 101
b) Ergebnisse 102
2. Versuche mit dem Paarungstest 104
a) Methodik 104
b) Ergebnisse 105
XVII. Der Einfluß von Kohlenmonoxyd auf die sexuelle Aktivität 109
a) Methodik 109
b) Ergebnisse 110
XVIII. Schwankungen der Kohlenmonoxydempfindlichkeit der sexuellen Aktivität und zur Frage der Wirkung von Licht auf die Hemmung der sexuellen Aktivität durch Kohlenmonoxyd 112
XIX. Die Bedeutung der Cytochromatmung für die sexuelle Aktivität 116
1. Die Verteilungsgleichung 116
2. Agglutination und Paarung in Kohlenmonoxyd .. 117
XX. Zur Charakterisierung des anoxybiontischen Stoffwechsels 120
1. Wasserstoffentwicklung unter anaeroben Bedingungen 120
a) Methodik 120
b) Ergebnisse 120
2. Über das Endprodukt der anaeroben Glykolyse.. 121

a) Methodik 121
b) Ergebnisse 122
XXI. Versuche mit Hillreagenzien 122
a) Methodik 123
b) Ergebnisse 123
XXII. Der Sauerstoffverbrauch und seine Beeinflussung durch sichtbare Strahlung 123
a) Methodik 124
b) Ergebnisse 124
XXIII. Die Lichtatmungsreaktion 129
1. Messung des Atmungsgrößenquotienten 129
2. Photoinduzierte Oxydation in Sauerstoff bzw. Luft 131
3. Dosis-Effekt-Kurven des Atmungsgrößenquotienten bei variiertem Quantenstrom 131
4. Das Wirkungsspektrum der Lichtatmungsreaktion und seine tagesperiodischen Schwankungen 132
a) Methodik 132
b) Ergebnisse 137
XXIV. Abschließende Betrachtungen 141
XXV. Zusammenfassung 157
XXVI. Literatur 166
XXVII. Tabellen 172
XXVIII. Abbildungen 186

I. Einleitung

Während die Gametogenese bei höheren Organismen mit tiefgreifenden morphologisch-anatomischen, meist irreversiblen Differenzierungen verknüpft ist, erscheint sie bei manchen Protisten (Bakterien, Hefen, niederen Volvocineen, konjugaten Algen) als eine rein physiologische, meist reversible Umstimmung der agamen vegetativen Zelle (isogame Hologamie). Hier besteht also eine Entwicklungsreaktion, die Gametogenese nur aus der Synthese der sexuellen Affinität. Damit scheinen die Voraussetzungen zur Aufklärung von physikalisch-chemischen Wirkungsketten dieser Entwicklungsreaktion bei Protisten mit isogamer Hologamie besonders günstig, vor allem wenn man darüber hinaus Objekte wählt, bei denen die sexuelle Differenzierung - unabhängig vom Geschlechtsbestimmungsmodus - durch äußere und innere Bedingungen entscheidend reguliert wird.

Einige Vertreter der über 500 Arten umfassenden Volvocalengattung Chlamydomonas (Phytoflagellat), wie z. B. Chlamydomonas eugametos und C. moewusii, erfüllen diese Voraussetzungen in vorzüglicher Weise (s. z. B. HARTMANN[51] sowie ETTL[35]):

Durch Untersuchungen an Gameten von verschiedenen Arten der einzelligen Chlamydomonaden gelang es bereits, wichtige Endprodukte der sexuellen Differenzierung in Form von geschlechtsspezifischen Befruchtungsstoffen (Gyno- und Androgamonen) zu fassen (FÖRSTER et al.[40, 41, 42], TRAINOR[135]) und damit die bipolare Zweigeschlechtlichkeit auch für isogame Formen trotz des Nichtzutreffens der früheren Angaben von MOEWUS[95] bis auf die chemischen Grundlagen zurückzuführen und zu sichern. Da auch bei anderen bis jetzt untersuchten Objekten (Bakterien, Hefen, Seeigeln, Forellen; Literatur bei HARTMANN[51, 52] und WIESE[157]) die agglutinierend wirkenden Gamone Glykoproteide sind, kann man mit gewisser Wahrscheinlichkeit annehmen, daß generell die sexuelle Affinität von Gameten - zumindest teilweise - in der Struktur bestimmter Glykoproteide begründet liegt. Dieser Effekt ist wohl zu unterscheiden von einer che-

motaktischen Anlockung der Gameten durch "Sirenine", wie sie neuerdings auch bei Chlamydomonas bekannt geworden ist (s. TSUBO[137] und WIESE[157]).

Andererseits ist bei Chlamydomonas auch über das Problem der äußeren und inneren Bedingungen, die die sexuelle Differenzierung auslösen seit KLEBS[70] wiederholt gearbeitet worden. Dabei konnte der ursprüngliche Befund von KLEBS[70, 71], wonach helles Licht und eine Verminderung der Nährsalze die Gametenbildung bei C. media fördern, weiter spezifiziert werden. Für einige Arten - C. reinhardti (SAGER et al.[122], FÖRSTER et al.[41], TRAINOR[135]), C. eugametos (BERNSTEIN et al.[7], TRAINOR[135], STIFTER[130]), C. moewusii var. rotunda (TSUBO[136]), C. chlamydogama (TRAINOR[135]) - wurde eine Erniedrigung des Stickstoffangebots im Medium als formativ wirkender Faktor für die Auslösung der Sexualität erkannt, während z. B. bei C. moewusii (BERNSTEIN et al.[7], TRAINOR[135]) der Stickstoffausarmung des Mediums diese Sonderrolle nicht zukommen soll. Trotzdem ist bis heute über die Funktion von stickstoffhaltigen Salzen als kopulationshemmende Agentien noch nichts bekannt.

Der Einfluß von sichtbarer Strahlung auf die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas ist neuerdings an den beiden kreuzbaren Rassen C. moewusii (LEWIN[87], FÖRSTER[38]) und C. eugametos (FÖRSTER[37], STIFTER[130]) eingehend untersucht worden. Dabei kamen die Autoren jedoch teilweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während das von LEWIN[87] für C. moewusii publizierte Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung dem Absorptionsspektrum des Chlorophylls ähnelt, erinnert das von FÖRSTER[37, 38] an C. moewusii und C. eugametos ♂ (zur Gametogenese von ♀ ist kein Licht notwendig) ausgearbeitete Wirkungsspektrum an einen absorbierenden Stoff von der Klasse der Schwermetallporphyrine (HARTMANN[50]), eine Ansicht, die auch von MOHR[100] geäußert wurde. STIFTER[130] ist dieser Diskrepanz in den Wirkungsspektren nachgegangen, hat aber nur eine rein spekulative Erklärung geben können.

Ausgehend von dieser Gesamtsituation soll versucht werden, die eingangs angeschnittene Grundfrage der Entwicklungsphysiologie, die Frage nach der reaktiven Natur der Entwicklungsvorgänge und ihrer Bestimmung durch spezifische Strukturen und äußere und innere Bedingungen, an Hand der Gametogenese von C. eugametos und C. moewusii einer Lösung näher zu bringen. Dabei stand die Aufgabe im Vordergrund, die Photorezeptoren, über die eine Beeinflussung der Gametogenese erzielt werden kann, zu identifizieren und in ihrer funktionellen Bedeutung zu erkennen. Es ist klar, daß der Bearbeitung dieser Aufgabe methodisch wichtige Untersuchungen vorausgehen müssen, die neben der Ausarbeitung eines quantitativen Tests vor allem eine weitgehende Standardisierung der Reaktionsfähigkeit des Materials als Ziel haben. Im Rahmen dieser Fragen schien es auch wertvoll, die Art der Kopulationshemmung durch stickstoffhaltige Salze näher zu charakterisieren.

II. Material und Anzucht

1. Material

Versuchsobjekte sind die Phytoflagellaten (Volvocales) Chlamydomonas moewusii GERLOFF, Wildtyp + und - Stamm*, isoliert von PROVASOLI, und Chlamydomonas eugametos MOEWUS, ♂ und ♀ Stamm, isoliert von MOEWUS (s. STARR[129]). Beide Formen sind haploid, diöcisch, iso-hologam und interfertil, wie zuerst von NYBOM[108] gezeigt worden ist. Nach Untersuchungen von LEWIN[85] bzw. WETHERELL[156] sind beide Rassen obligat photoautotroph.

---

*Um Verwechslungen mit den mathematischen Vorzeichen + und - zu vermeiden, werden für die Klonbezeichnungen + (plus) und - (minus) im folgenden stets die Zeichen ⊕ und ⊖ verwendet.

2. Anzucht

Die vier Klone werden als Reinkulturen in Petri-Schalen (10 cm ø), die mit 40 cm^3 sterilem KNOP-Agar der folgenden Zusammensetzung beschickt sind, vegetativ vermehrt: Auf 1000 cm^3 doppelt über Quarz destilliertes Wasser (= H_2O) kommen Agar-Agar 15 g, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$ 0,6 g, KNO_3 0,15 g, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,15 g, $KH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$ 0,15 g, Sp 2 cm^3; Sp = Spurenelementlösung in Anlehnung an ARNON[3] und WARBURG et al.[152], enthält in 1000 cm^3 n/200 H_2SO_4, 500 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 1000 mg $Fe(NO_3)_3 \cdot 9\ H_2O$, 300 mg H_3BO_3, 200 mg $MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$, 50 mg $NaVO_3 \cdot 4\ H_2O$, 22 mg $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 8 mg $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, 3 mg $CoSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 2 mg $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$. Der pH-Wert des Nährbodens liegt nach 4-wöchiger Kultur bei 5,5. Zum Animpfen wird wie folgt verfahren: Etwa 35 Tage alte Kulturen, die bis zu $4{,}5 \cdot 10^8$ Zellen/Schale enthalten, werden mit etwa 25 cm^3 H_2O übergossen. Nachdem die Zellen frei beweglich sind, wird etwa 1 cm^3 der Suspension ($\approx 1{,}5 \cdot 10^7$ Zellen) pro anzuimpfender Schale gleichmäßig verteilt. Durch Anordnen über Leuchtstofflampen (Abstand = 15 cm, 12 Stdn.) wird das überschüssige Wasser an den Schalendeckel kondensiert. Nach Entfernen des Kondenswassers werden die Schalen in "künstlichen Sonnen" (Abb. 1) bei 1100 ± 100 Lux gestapelt. Als Strahlungsquelle dienen Leuchtstofflampen der Fa. OSRAM vom Typ HNG*200, 40 Watt. Die hier und im folgenden verwendeten Strahlungsquellen wurden über vorgeschaltete magnetische Spannungsgleichhalter (Type M 100, 220 V~, 0,1 KVA der Fa. RUHSTRAT oder 220 V~, 0,5 KVA der Fa. STEINLEIN) betrieben. Die verwendeten Licht:Dunkel-Wechsel (L:D) sind 14 h:10 h und 12 h:12 h bzw. Dauerlicht (DL). Die Temperatur wird auf 20 ± 1 °C gehalten. Unter diesen Bedingungen wachsen die Zellen palmelloid (s. LEWIN[86]). Bei Verwendung von etwas alkalischeren Nährböden (bis pH 7) tritt ein mit dem pH-Wert ansteigender Prozentsatz von begeißelten Zellen auf. Auf dieser Basis sind wahrscheinlich die Beobachtungen von FÖRSTER et al.[39] und HAGEN-SEYFFERTH[49] über wechselnde Prozentsätze von begeißelten Zellen zu erklären.

---

*Diese relativ rotreiche Strahlung (auch HNI) hat sich gegenüber blaureicher (HNW, HNT) bezüglich der sexuellen Aktivität als wesentlich günstiger erwiesen (siehe auch S. 152 ff.).

III. Grundmethoden

1. Auslösung der Geißelbildung und der Sexualität

Entsprechend der zuerst von KLEBS[70] bei C. media verwendeten Methode wurden die Zellen zur Auslösung der Sexualität bei Nachtbeginn mit H_2O (15-25 cm^3/Schale) vom Agar abgeschwemmt (vergl. auch FÖRSTER et al.[39]), auf die gewünschte Zelldichte gebracht und bis zu 80 cm^3 Zellsuspension in schwarz lackierten 200 cm^3 Erlenmeyerkolben (Gasaustausch!) bei 20 ± 0,1 °C im Dunkelthermostaten gehalten. Die Zelldichte w, d. h. das Naßvolumen der Zellen pro Kubikzentimeter Suspension wurde durch Zentrifugieren im Hämatokritten (10 min 800 g) bestimmt und in cm^3/cm^3 angegeben.

Auf Grund der Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der Paarung (V) wurde später an Stelle von H_2O die in VI b angegebene Suspendierlösung S verwendet.

Entsprechend den Angaben von FÖRSTER et al.[39], HAGEN-SEYFFERTH[4] WETHERELL[156] und LEWIN[86] wurden bei allen vier Klonen >95 % der Zellen auch im Dunkeln 10...60 min nach dem Suspendieren voll begeißelt und beweglich und blieben es teilweise bis zu 8 Tagen.

2. Dunkelkammerbeleuchtung

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von FÖRSTER[37,38] wurde anfangs als Dunkelkammerbeleuchtung nur dunkelrote Strahlung mit Wellenlängen $\lambda > 650$ nm verwendet. Bei Expositionszeiten bis zu 1 min, wie sie praktisch vorkamen, war diese Strahlung ohne Einfluß auf die sexuelle Aktivität der Zellen.

Ab XIII ist auf Grund der dort gewonnenen Erkenntnisse an Stelle von dunkelroter Strahlung nur noch grüne (λ = 500...520n verwendet worden. Dabei waren die Zellsuspensionen beim Pipettieren für höchstens 20 sec einer Intensität von 1,3 erg/cm^2

ausgesetzt. Diese Dosis war ebenfalls ohne Einfluß auf die sexuelle Aktivität der Zellen.

3. Der Agglutinationstest

Als halbquantitativer Test für die sexuelle Aktivität der Zellen leistet der Agglutinationstest gute Dienste. Hierzu wurden jeweils $\approx 0{,}1\ cm^3$ Zellsuspension zweier verschiedener Klone auf Objektträger gegeben und etwa 1 min nach dem Mischen unter der Binokularlupe (bei bis zu 100-facher Vergrößerung) sofort nach Einschalten der Belichtung (250 Lux von OSRAM HNI de Luxe 500, 65 Watt) die Stärke der Dunkelagglutination an der Zahl und Größe der Kopulationsgruppen abgeschätzt. Es gelingt auf diese Weise zu unterscheiden, ob das Material nicht agglutiniert = 0, vereinzelt kleine Gruppen von bis zu 10 Zellen auftreten = 1, etwa die Hälfte der Zellen in Gruppen verhaftet ist = 2 oder nahezu alle Zellen agglutinieren = 3.

FÖRSTER et al.[42] haben gezeigt, daß die Kopulationsgruppen durch Verkleben der Geißelenden entstehen und Gamone mit Glykoproteidcharakter an dieser Reaktion beteiligt sind. Die Existenz von Gamonen ist also eine notwendige Voraussetzung für den Ablauf der Agglutination. Es ist jedoch vorerst nicht bekannt, ob an der Agglutinationsreaktion von Chlamydomonas neben den Gyno- und Androgamonen noch andere Substrate oder Fermente beteiligt sind. Es wäre demnach denkbar, daß die Agglutination trotz Anwesenheit von Gamonen nicht abläuft. Da sexuell aktive Zellen aber nach Zugabe von isolierten Gamonen des anderen Geschlechts isoagglutinieren (FÖRSTER et al.[40]), kann der Agglutinationstest als Test für die Anwesenheit von Gamonen gewertet werden, wenn sicher ist, daß der verwendete Testklon sexuell voll aktiv ist.

4. Bestimmung des Zellvolumens

Das Durchschnittvolumen der Zellen wurde unter Benutzung der Beziehung

$$v = w/z \qquad (1)$$

bestimmt. Hierbei ist z = Zahl der Zellen/cm^3 Suspension. w wurde wie oben (III 1) an Suspensionen lebender Zellen, z nach dem Fixieren mit LUGOL'scher Lösung[117] ($\approx$ 0,1 cm^3/5 cm^3 Zellsuspension) in einer Blutkörperchenzählkammer bestimmt.

5. Der Paarungstest

a) Versuchsbedingungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden als Reaktionsgefäße 10 cm^3 Erlenmeyerkölbchen - für Dunkelproben schwarz lackiert - mit Kappen verwendet. Die Versuche liefen bei 20 $\pm$ 0,1 °C im Wasserbad ab.

b) Die Paarung

Mischt man gut agglutinierendes Material verschiedenen Geschlechts im Licht, so werden nach etwa 10 min die ersten Kopulationspaare, bei denen die Partner durch eine Protoplasmabrücke verbunden sind (GIBBS et al.[44]) und die Geisseln ihre "Klebrigkeit" verloren haben (vergl. hierzu LEWIN[86]), aus den Gruppen frei. Nach etwa 30 min sind die Gruppen in Paare aufgelöst. Wie von GIBBS et al.[44] gezeigt worden ist, sind die Blepharoplasten nach 1...4 h durch die Plasmabrücke gewachsen und bilden einen elektronendichten Kern derselben. Im Dunkeln laufen die Prozesse etwas langsamer ab.

c) Die Auswertung

Da die Zellverschmelzung bei Belichtung erst nach etwa 8 h beginnt und im Dunkeln meist ganz ausbleibt, kann man > 1 h nach dem Mischen in Anlehnung an die von FÖRSTER[37] entwickelte Methode mit LUGOL'scher Lösung[117] ($\approx$ 0,1 cm^3/5 cm^3 Zellsuspension) fixieren. Nach dieser Zeit sind die Paare genügend fest verbunden. Aus sorgfältig angefertigten Deckglaspräparaten wird bei 500-facher Vergrößerung (Phasenkontrast) das Verhältnis der Zahl der Paare (= P) zu der Zahl der Einzelzellen (= E) bestimmt. Um sicher zu sein, daß jede Zelle des Klones = y, dessen sexuelle Reaktionsfähigkeit interessiert einen kopulationsfähigen Partner des anderen Geschlechts = x gefunden hat, wurde dieses im sexuell vollaktiven Zustand in mehrfachem Überschuß zugegeben. Die Zahl der gepaarten y-Zellen ist dann P, die Gesamtzahl der gezählten Zellen n = (2 P + E). Ist ferner bekannt, wieviele x-Zellen (= f) auf eine y-Zelle treffen, so gibt der Bruch $\frac{2\,P + E}{f + 1}$ den Anteil der y-Zellen in der Suspension an. Der Bruchteil der gepaarten y-Zellen ergibt sich dann zu:

$$G = \frac{P}{2\,P + E}\,(f + 1) \qquad (2)$$

wobei $0 \leq G \leq 1$ und $f > 1$. Zur Bestimmung von f bin ich wie folgt verfahren: Ist V_x = Volumen der eingesetzten Zellsuspension in cm^3 und z = Zahl der Zellen/cm^3, so ergibt sich:

$$f = \frac{V_x \cdot z_x}{V_y \cdot z_y} \qquad (3)$$

Unter Verwendung der Beziehung (1) kann man (3) auch schreiben:

$$f = \frac{V_x \cdot w_x \cdot v_y}{V_y \cdot w_y \cdot v_x} \qquad (4)$$

d) Dunkelgametentiter und potentieller Gametentiter

Ein schwankender Prozentsatz an Zellen ist schon im Dunkeln paarungsfähig (= G_d). Dieser Bruchteil G_d wird im folgenden

als "Dunkelgametentiter" bezeichnet.

Unter "potentiellem Gametentiter" = G_p verstehen wir den Bruchteil der Population, der nach 30...120 minutiger Exponierung bei Kulturintensität (1100 Lux von HNG) paarungsfähig ist.

e) Auswertungs- und Versuchsfehler

In einer Versuchsserie wurden zum Pipettieren von V_x bzw. V_y jeweils die gleichen Pipetten verwendet. Man erhält dann bei Differenzpipettierungen mit 1-cm^3-Pipetten einen mittleren Pipettierfehler $\sigma \approx \pm$ 0,005 cm^3, mit 5-cm^3-Pipetten $\sigma \approx \pm$ 0,02 cm^3 mit 10-cm^3-Pipetten $\sigma \approx \pm$ 0,05 cm^3. Das Naßvolumen der Zellen w kann mit einer relativen Genauigkeit von $\sigma_{rw} = \pm$ 5 % bestimmt werden. Schließlich liefern noch die Durchschnittsvolumen der Zellen (v_x, v_y) als fehlerhafte Größen einen Beitrag zum Fehler von G.

Berechnet man die absolute Paarungsrate G nach Gleichung (2) und (4), d. h. nach

$$G = \frac{P}{2\,P + E} \cdot \left(\frac{V_x \cdot w_x \cdot v_x}{V_y \cdot w_y \cdot v_x} + 1 \right) \qquad (5)$$

so kann der mittlere Fehler von G ($= \sigma_G$) aus den Fehlern der sieben eingehenden Bestimmungsgrößen (P/n, V_x, V_y, w_x, w_y, v_x, v_y) nach dem GAUSS'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz (s. z. B. KOHLRAUSCH[75])

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\partial F}{\partial x_i} \sigma_{x_i} \right)^2 \qquad (6)$$

berechnet werden. Die relative Häufigkeit für das Auftreten von Pärchen ist $\frac{P}{P + E}$. Dieser Wert ist als Schätzung des entsprechenden Parameters des Kollektivs mit einem mittleren Fehler $\sigma = \sqrt{\frac{P \cdot E}{(P + E)^3}}$ behaftet (s. z. B. KOLMER[76]). Das Verhältnis P/E wurde stets so bestimmt, daß $500 < (F + E) \leq 5000$. In der Regel liegt f im Bereich $2 \leq f \leq 4$ und G im Bereich $0{,}1 \leq G \leq 0{,}9$. Dies bedeutet, daß P klein wird gegen E. Bei

der Bildung des Differentialquotienten $\partial F / \partial \frac{P}{n}$ kann daher ohne großen Fehler $\frac{P}{2P+E} = \frac{P}{P+E} = \frac{P}{n}$ gesetzt werden. Entwickelt man (6) für die Gleichung (5), so erhält man:

$$\sigma_G^2 = (\frac{\partial G}{\partial P/n}\sigma_{P/n})^2 + (\frac{\partial G}{\partial V_x}\sigma_{V_x})^2 + (\frac{\partial G}{\partial w_x}\sigma_{w_x})^2 + (\frac{\partial G}{\partial v_y}\sigma_{v_x})^2 + (\frac{\partial G}{\partial V_y}\sigma_{V_x})^2 + (\frac{\partial G}{\partial w_y}\sigma_{w_y})^2 + (\frac{\partial G}{\partial v_x}\sigma_{v_x})^2. \quad (7)$$

Nach Bildung der partiellen Ableitungen und Einsetzen der folgenden dem Protokoll entnommenen charakteristischen Wertegruppe:

$P/E = 150/600$; $V_{\mathbb{Q}} = 3{,}00 \pm 0{,}02$; $V_{\mathbb{Q}} = 0{,}500 \pm 0{,}005$;
$w_{\mathbb{Q}} = (0{,}35 \pm 0{,}02)\cdot 10^{-3}$; $w_{\mathbb{Q}} = (10{,}0 \pm 0{,}5)\cdot 10^{-3}$;
$v_{\mathbb{Q}} = (3{,}1 \pm 0{,}2)\cdot 10^{-10}$; $v_{\mathbb{Q}} = (5{,}8 \pm 0{,}3)\cdot 10^{-10}$

findet man für σ_G^2 bei Anordnung gemäß (7):

$$\sigma_G^2 = (28{,}3 + 0{,}06 + 4{,}4 + 7{,}5 + 0{,}05 + 4{,}8 + 6{,}1)\cdot 10^{-4} \quad (8)$$

oder $\sigma_G = \pm 0{,}07$. Das zugehörige G errechnet sich nach (5) zu G = 0,59. Bei vergleichender Betrachtung von (7) und (8) erkennt man sofort, daß die Pipettierfehler vernachlässigt werden können. Um auch die Fehler von w und v aus dem Endergebnis zu eliminieren, genügt es, statt der absoluten Paarungsrate G die relative Paarungsrate G/G_{max} als Maß für die Reaktionsfähigkeit des Materials zu verwenden. Hierbei steht für G_{max} die im Versuch beobachtete maximale Paarungsrate, meist identisch mit dem potentiellen Gametentiter G_p (s. III 5 d). G/G_{max} wird dann bestimmt durch den Bruch:

$$\frac{G}{G_{max}} = \frac{P}{(2P+E)} \cdot \frac{(2P_{max} + E_{max})}{P_{max}} \quad (9)$$

Der Faktor (f + 1) fällt heraus, da f innerhalb einer Versuchsserie abgesehen von den zu vernachlässigenden Pipettierfehlern, konstant ist. Der Fehler von G_{max} kann ebenfalls vernachlässigt werden. Er äußert sich lediglich in einer Streckung der G/G_{max}-Skala und wirkt sich daher auf alle Werte gleichsinnig aus. Unterschiede zwischen den G/G_{max}-Werten bleiben also proportional erhalten. Der mittlere Fehler von G/G_{max} kann deshalb in guter Näherung angegeben werden als:

$$\sigma_{G/G_{max}} = \frac{2\,P_{max} + E_{max}}{P_{max}} \cdot \sigma_{P/n} = \frac{2\,P_{max} + E_{max}}{P_{max}} \cdot \sqrt{\frac{P \cdot E}{(P+E)^3}} \quad (1$$

f) Prüfung auf Signifikanz

In Fällen, in denen eine Differenz $d = |G_1 - G_2|$ auf Signifikanz zu prüfen war, wurde über Bestimmung des Sicherheitskoeffizienten

$$c = \frac{d}{\sigma_d} \quad \text{mit} \quad \sigma_d^2 = \sigma_{G_1}^2 + \sigma_{G_2}^2 \qquad (11)$$

der zugehörige Grad der Sicherung P aus einer Tafel des normalen Wahrscheinlichkeitsintegrals entnommen (s. z. B. PÄTAU[109]).

g) Die Bedeutung des Tests

Der Paarungstest liefert somit über die Bestimmung der G-Werte ein quantitatives Maß für die sexuelle Reaktionsfähigkeit des Materials, setzt jedoch gegenüber dem Agglutinationstest den Ablauf der Plasmabrückenbildung, einer weiteren komplexen biologischen Reaktion, voraus. Man muß damit rechnen, daß verschiedene Faktoren die Gamonsynthese, die Agglutination und die Plasmabrückenbildung verschieden beeinflussen. So konnte z. B. KÖHLER[73] bei Chaetomorpha aerea durch Zugabe von Proteinase die Fusion der Gameten verhindern, ohne jedoch die Agglutination zu hemmen. Das bedeutet, daß bei Zellen die agglutinieren, nicht notwendig die Plasmabrückenbildung abläuft. Deshalb kann der G/G_{max}-Wert nur als untere Grenze für die Größe der Gamonsynthese und Agglutination gelten. Parallelversuche mit dem Agglutinationstest sind daher Voraussetzung für die Gewinnung eindeutiger Aussagen.

6. Die elektronenoptische Präparation

Sie erfolgte nach der bei HEITZ[57] angegebenen Methode: Fixierung mit 1 %iger OsO_4-Lösung in Veronal-Puffer von pH 7,2;

1...2 h bei + 4 °C. Einbettung in Methyl-Butyl-Methacrylat. Herstellung der Schnitte mit dem PORTER-BLUM-Mikrotom (Glasmesser). Untersuchung mit dem Elmiskop I von SIEMENS. Diese Präparation wurde freundlicherweise von der technischen Assistentin Fräulein DÖRMER durchgeführt.

7. Die pH-Messung

Sie erfolgte mit einem BECKMAN Glas Electrode pH-Meter, Model H 2 und ist auf ± 0,1 pH genau.

8. Chemikalien

Alle verwendeten Substanzen und Reagentien waren p. a. Substanzen, meist von der Fa. MERCK.

9. Zellzeit

Bei im Licht:Dunkel-Wechsel gezüchteten Kulturen wird die Zellzeit = Z angegeben in Stunden = h vor (= -) und nach (= +) dem ersten "erwarteten Belichtungsbeginn" nach dem Suspendieren. Bei Dauerlichtkulturen wird vom Zeitpunkt des Suspendierens ab in Stunden gezählt. Die Zeitpunkte des Suspendierens = S, des Belichtungsbeginns = B, des Einmischens des Testklones = M, sowie des Fixierens = F werden in Zellzeit angegeben.

IV. Einige Befunde zur Physiologie und Morphologie der Zelle als Funktion des Kulturalters.

1. Sexuelle Aktivität

5...40 Tage alte im 14 h:10 h Licht:Dunkel-Wechsel gezüchtete Kulturen wurden 10 h nach dem Suspendieren ($w = (1...10)\cdot 10^{-3}$) d. h. zur Zeit des "erwarteten Belichtungsbeginns" (Z = 0 h) im Agglutinationstest auf ihre sexuelle Reaktionsfähigkeit ge-

prüft. Während ⊕ und ⊖ bereits nach 8-tägiger Agarkultur Tendenz zur Dunkelagglutination zeigen (s. a. FÖRSTER[38]) erscheint diese bei ♂ und ♀ erst nach rund 14-tägiger Kultur. Zu dieser Zeit hat die Reaktionsfreudigkeit zwischen ⊕ und ⊖ bereits ihr Optimum erreicht (s. Tabelle 1). Dabei reagieren ⊖ stets etwas besser als ⊕. ♂ und ♀ erreichen nach > 20-tägiger Kultur ebenfalls Reaktionsstärken von 2...3, wobei ♀ etwas stärker agglutinieren als ♂. Bei Kulturen, die über 40 Tage alt sind, fällt die Reaktionsstärke wieder ab. Nach 30 ± 5 Tage langer Kultur zeigten demnach alle 4 Klone optimale Agglutinierfähigkeit mit Reaktionsstärken zwischen 2 und 3. Die zwischen den 4 Klonen möglichen Kombinationen und ihre sexuelle Reaktion sind in Tabelle 1 dargestellt. Man erkennt daraus, daß - übereinstimmend mit den Angaben von FÖRSTER[38] - ♂ und ⊕ einerseits und ♀ und ⊖ andererseits bezüglich des Geschlechts homolog sind.

2. Zellgröße

Neben diesem artspezifischen Unterschied bei der Ausprägung der Dunkelagglutinierfähigkeit fällt auf, daß die Zellgröße sich während der Kultur ebenfalls artspezifisch ändert (s. Tabelle 2). Nach 16-tägiger Agarkultur beträgt das durchschnittliche Zellvolumen bei allen 4 Klonen etwa 360 μ^3 (entspricht einer Kugel mit 8,8 μ Durchmesser). Nach 4-wöchiger Kultur ist das Zellvolumen von ♂ und ♀ auf rund 580 μ^3 (= Kugel mit 10,4 μ Durchmesser) angestiegen, wogegen ⊕ und ⊖ eher eine Abnahme des Zellvolumens (v = 306 μ^3 = Kugel mit 8,4 μ Durchmesser) zeigen.

3. Reservestoffe

Schon im lichtoptischen Grenzbereich war zu erkennen, daß mit zunehmendem Kulturalter neben einem starken Anwachsen des Pyrenoids, in dem krug förmigen Chloroplasten granuläre Einschlüsse auftreten. Dieses Phänomen beobachtet man bei ⊕ und ⊖ schon nach 8-tägiger Kultur (L:D = 14 h : 10 h), bei

♂ und ♀ jedoch erst nach 14-tägiger Kultur. An Hand von elektronenoptischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, daß es sich bei den granulären Einschlüssen im Chloroplasten hauptsächlich um interlamellare Speicherung von Stärke handelt (s. Abb.2). Daneben treten auch Öltröpfchen auf, die auf Grund der Osmiumfixierung sehr elektronendicht erscheinen. SAGER et al.[123] haben an C. reinhardti ähnliche Beobachtungen gemacht.

V. Die pH-Abhängigkeit der Agglutination und Paarung

a) Methodik

Nach Ergebnissen von WIESE (aus STIFTER[130]) wird die Kopulation bei C. eugametos bereits durch Salzkonzentrationen von etwa 10^{-3} mol gehemmt. C. moewusii verträgt etwas höhere Konzentrationen (FÖRSTER[38]). Zur Prüfung des Einflusses des pH-Wertes auf die Paarung mußten daher Puffer mit der Ionenstärke $\mu \leq 2 \cdot 10^{-3}$ (berechnet nach $\mu = 1/2 \sum c_i z_i^2$, wie z. B. bei LEUTHARDT[82] angegeben) verwendet werden. Mischen von $4{,}0 \cdot 10^{-3}$ mol KH_2PO_4 (pH = 4,5; $\mu \approx 4 \cdot 10^{-3}$) und $1{,}33 \cdot 10^{-3}$ mol K_3PO_4 (pH = 9,9; $\mu \approx 4 \cdot 10^{-3}$) ermöglichte Untersuchungen im pH-Bereich 4,8...9,3. Die Versuche wurden bei 20 ± 0,1 °C (Wasserbad) in 25-cm^3-Erlenmeyerschliffstopfenkolben durchgeführt, die mit 10 cm^3 Puffer beschickt waren. 1 h vor dem erwarteten Belichtungsbeginn wurden 9 cm^3 ♀- bzw. ♂-Suspension zupipettiert; 30 min später wurde 1 cm^3 ♀-Suspension eingemischt. Die Ionenstärke war nun $\mu \approx 2 \cdot 10^{-3}$. 180 min nach dem Mischen wurde fixiert. Der pH-Wert wurde kurz vor dem Fixieren gemessen. Ausgewertet wurde nach dem Paarungstest.

b) Ergebnisse

In Abb. 3 sind die Ergebnisse einiger Versuche dargestellt. Die optimalen pH-Bereiche (für $P \leq 0{,}0027 \equiv 3\,\sigma$-Bereich) sind angegeben. Als Mittelwert ergibt sich pH 6,50...7,05.

Ein rassenspezifischer Unterschied in der pH-Abhängigkeit der Paarung konnte nicht gesichert werden.

Versuche mit dem Agglutinationstest ($w_x \approx w_y \approx 2 \cdot 10^{-3}$) haben ergeben, daß kopulationsfähige Zellen beim Einbringen in Puffer mit pH $<$ 6 oder $>$ 8 bereits in der Agglutination deutlich gehemmt sind. Für pH $<$ 5 und $>$ 9 konnte keine Gruppenbildung mehr beobachtet werden und die Zellen werfen beim Abpuffern auf pH $<$ 4,5 bzw. pH $>$ 9,5 die Geißeln ab. Dieser Befund steht in guter Übereinstimmung mit den Angaben von HAGENSEYFFERTH[49].

VI. Die Suspendierlösung zur Auslösung der Sexualität

a) Problematik

Das Problem war also, eine Suspendierlösung zu entwickeln, deren pH-Wert bei einer Ionenstärke von $\mu \leq 2 \cdot 10^{-3}$ und Zelldichten von $w \approx 10^{-3}$ zur Zeit der Versuche, d. h. 10...36 h nach dem Suspendieren der Zellen im Bereich 7,1...6,5 liegt. Diese Bedingung ist bei Suspendierung in H_2O nicht erfüllt. FÖRSTER[37] gibt eine Suspendierlösung an, die sich aus $4 \cdot 10^{-4}$ mol $MgSO_4$, $5 \cdot 10^{-4}$ mol $CaCl_2$ und $7 \cdot 10^{-4}$ mol $NaHPO_4$ zusammensetzt und deren pH $\approx$ 7 ist. Auf Grund eines ihm unterlaufenen Rechenfehlers (aus dem Originalprotokoll ersichtlich) hat er jedoch stets eine Lösung verwendet, deren Salz-Konzentrationen 1/10 der angegebenen betrugen. Schwemmt man Zellen mit dieser Lösung vom Agar (pH $\approx$ 5,5) ab, so liegt der pH-Wert der Zellsuspension ($w = 10^{-3}$) direkt nach dem Suspendieren bei 6,5...6,7, ist jedoch auf Grund der Kohlensäureretention nach etwa 10 h auf pH $\approx$ 6 abgefallen und damit zu sauer. STIFTER[130] hat in der Lösung von FÖRSTER[37] das sekundäre Phosphar durch primäres ersetzt, also eine Lösung verwendet, die $4 \cdot 10^{-5}$ mol $MgSO_4$, $5 \cdot 10^{-7}$ mol $CaCl_2$ und $7 \cdot 10^{-5}$ mol NaH_2PO_4 enthielt und deren pH-Wert bei $\approx$ 4,5 liegt. Seine Bedingungen für den Ablauf der Sexualität waren somit noch ungünstiger, wie er auch selbst bei versuchsweiser Verwendung der Lösung von FÖRSTER[37]

festgestellt hat. Da eine geringe Änderung der Wasserstoffionenaktivität in dem Bereich von pH 5...6 eine große Änderung der Paarungsrate zur Folge hat (vergl. Abb. 3), werden die Ergebnisse von STIFTER[130] über den Einfluß des CO_2-Partialdruckes auf die Kopulation sehr unsicher. Sie müssen nämlich zum Teil als reiner pH-Effekt gedeutet werden, zumal STIFTER[130] keine überprüfenden pH-Messungen durchgeführt hat.

b) Ergebnisse

Im Laufe der Untersuchungen hat sich schließlich folgende Lösung S als brauchbar erwiesen: $6{,}7 \cdot 10^{-4}$ mol K_3PO_4; $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ mol $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; $1{,}2 \cdot 10^{-4}$ mol $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$; 1 cm^3 Sp/l (s. II 2). Ihr pH liegt bei 9,9. Wegen der Bedeutung des Kaliums für die oxydative Phosphorilierung (s. z. B.bei LATZKO[80]) wurde ein Kaliumsalz als Puffersubstanz verwendet. Die Verwendung eines Kaliumsalzes wird auch durch die Befunde von RONKIN et al.[118] über die Beteiligung von Kalium am Bewegungsmechanismus von Chlamydomonas gerechtfertigt.

30 ± 5 Tage alte Agarkulturen (L:D = 14 h:10 h oder 12 h:12 h) abends in S suspendiert, lieferten am darauffolgenden Morgen nach 30...120 minütiger Belichtung durchweg Paarungsraten G_p von > 70 %, in etwa 4 von 10 Fällen sogar > 80 %. Damit ist eine der wesntlichen Voraussetzungen für eine Analyse des Einflußes anderer Faktoren auf die sexuelle Aktivität von C. eugametos und C. moewusii erfüllt.

FORSTER[37,38] und STIFTER[130] dagegen (persönliche Mitteilung) konnten nur in etwa 1 von 3 Fällen absolute Paarungsraten von > 70 % erzielen. In etwa 1/3 der Fälle war die Ausbeute sogar < 30 %.

VII. Die Proportionalität des Paarungstestes

Im folgenden soll geklärt werden, ob die nach Gleichung (5) bestimmten Paarungsraten von f unabhängig sind, sofern nur das Verhältnis der sexuell aktiven Zellen beider Geschlechter $f_a \geqq 1$. LEWIN[87] hat für C. moewusii gezeigt, daß, falls die aktiven ⊕- bzw. ⊖-Zellen gegenüber den aktiven ⊖- bzw. ⊕-Zellen in der Minderheit sind, die Zahl der Paare pro cm^3 der Zahl der ⊕- bzw. ⊖-Gameten pro cm^3 proportional ist. Damit ist die Frage für C. moewusii positiv beantwortet. Offen war jedoch, ob dasselbe auch für Paarungen bei C. eugametos und Kreuzungen zwischen C. eugametos und C. moewusii gilt. ich habe daher die folgenden Versuche gemacht: In S suspendierte ⊕- und ♀-Zellen wurden z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns in verschiedenem Verhältnis gemischt und nach 2 h fixiert. Bei einem zweiten Versuch wurde nach dem Mischen der Geschlechter mit Kulturintensität (1100)Lux) belichtet. Die weiteren Daten sind in Tabelle 3 erfaßt. Man findet innerhalb beider Versuche nur rein zufällige Abweichungen der $G_{\oplus}$-Werte voneinander. Die Hypothese, daß die nach Gleichung (5) bestimmten $G_{\oplus}$-Werte für $f_a \geqq 1$ von f unabhängig sind, ist also mit dem Ergebnis verträglich und zwar sowohl bei Dunkelgameten wie auch bei lichtinduzierten Gameten. Das Ergebnis zeigt außerdem, daß zum Ablauf der Paarung sich beide Kopulationspartner in einem ganz bestimmten physiologischen Zustand befinden müssen; es genügt offenbar nicht, wenn nur ein Geschlecht sexuell aktiv ist (s. a. XI 1). Diese Tatsache ist eine wichtige Voraussetzung für die meisten Versuche.

VIII. Die Regulation der sexuellen Aktivität durch Ammoniumionen

a) Methodik

Zellen

Die verwendeten Kulturen sind bei L:D = 14 h:10 h gezüchtet worden; die Zellen wurden abends mit ≈ 2½ cm^3 H_2O/Schale vom

Nährboden abgeschwemmt, auf der Zentrifuge (5 min 350 g) zweimal in H_2O gewaschen und anschließend in S resuspendiert, bei 20 °C dunkel gehalten.

Gaswechselmessungen

Sie wurden mit der manometrischen Methode durchgeführt (s. z. B. NEGELEIN[106]). Die Manometer waren einfache Doppelkapillarmanometer (Volumen = 1,43...1,76 cm^3). Um die Genauigkeit der Methode zu erhöhen, wurde an Stelle von BRODIE'scher Lösung (p_o = 10 000 mm) auch Octan als Manometersperrflüssigkeit verwendet. Das verwendete Octan hatte ein spezifisches Gewicht von 0,737 g/cm^3. In der Formel

$$x = h \cdot \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha}{p_o} = h \cdot k$$

ist daher für p_o = 760 mm Hg = $\frac{760 \cdot 13,6}{0,737} \approx$ 14 000 mm Octan zu setzen. Neben kegelförmigen Gefäßen (Volumen = 12,2...16,3 cm^3) mit einer Birne und zylindrischem Einsatz kamen die neuerdings von WARBURG et al.[150] entwickelten rechteckigen Kastengefäße (Volumen = 17,26...17,99 cm^3) mit zentraler Wanne und einer Birne zur Anwendung. Diese Gefäße bieten den Vorteil, daß der Gasaustausch schneller erfolgt.

In Anlehnung an WARBURG[144] wurde horizontal geschüttelt mit einer Frequenz von ν = 3 sec^{-1}, und einer Amplitude ε = 1,0 cm. Die Temperatur des Versuchsthermostaten wurde auf 20 ± 0,05 °C gehalten.

Ammoniumbestimmung im Medium

Die Zellen wurden abgeschleudert (10 min 1000 g) und 5 cm^3 Überstand mit 0,2 cm^3 NESSLERs Reagens versetzt. 20 min nach dem Mischen wurde in 1-cm-Küvetten bei 436 nm photometriert (Photometer EPPENDORF) gegen 5 cm^3 S mit 0,2 cm^3 Reagens. Die Eichkurve wurde mit Zellüberstand aufgenommen.

b) Ergebnisse

1. Der Einfluß von Ammoniumionen auf die Paarungsrate und Agglutination

3...4 Wochen alte Kulturen von ♀ - die nach IV 1 im Reaktionsoptimum sind,- reagieren auf Zugabe von $> 5 \cdot 10^{-5}$ mol NH_4Cl mit einem Abfall der Paarungsrate (s. Abb. 4 und 5). Dabei zeigt sich, daß die Hemmung mit zunehmender Einwirkungszeit zunimmt. Selbst $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl hemmt bei Einwirkungszeiten < 5 min kaum. Erst nach etwa 60 min ist bei dieser Konzentration die erreichbare Hemmung voll ausgeprägt. Dagegen sind die nach Zugabe von $< 2 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl auftretenden Depressionen in der Paarungsrate nach 60 min fast wieder verschwunden. Der Kontrolltiter wird aber nicht mehr erreicht. Entsprechende Konzentrationen von KCl sind praktisch ohne Einfluß.

Kulturen, die $>$ 30 Tage alt sind, reagieren auf vergleichbare Konzentrationen NH_4Cl prinzipiell umgekehrt. Solche Kulturen zeigen nach Zugabe von NH_4Cl keinen (Abb. 6) oder nur einen kurzzeitigen Abfall der Paarungsrate (Abb.7). Die Paarungsrate wird hier durch Zugabe von NH_4Cl mit zunehmender Einwirkungszeit signifikant verbessert.

Ganz entsprechende Ergebnisse erhält man mit dem Agglutinationstest: Unmittelbar nach dem Einstellen von NH_4Cl-Konzentrationen bis zu $5 \cdot 10^{-4}$ mol ist die Agglutinierfähigkeit der Zellen nicht gehemmt; höhere Konzentrationen - auch von KCl - nehmen Beweglichkeit und Agglutination. Dagegen hat eine 1-stündige Vorbehandlung mit $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl bei $<$ 30 Tage alten Kulturen bereits eine deutliche Hemmung der Agglutinierfähigkeit zur Folge; die gleiche Behandlung bringt bei>40 Tage alten Kulturen eine deutliche Verbesserung der Agglutination.

An Hand dieser Ergebnisse wird es wahrscheinlich, daß die Beeinflussung der sexuellen Aktivität durch Ammoniumionen über die Assimilation derselben zustande kommt.

2. Spezifische Hemmung der Agglutination durch Blausäure

Vergleichsweise wird die Agglutination durch Blausäure spezifisch gehemmt. Sofort nach dem Einstellen von 10^{-4} mol KCN ist die Agglutinierfähigkeit der Zellen merklich verschlechtert. Daneben tritt auch eine geringe Hemmung der Beweglichkeit in Erscheinung.

Bei Versuchen mit dem Paarungstest tritt die unterschiedliche Wirkung der Ammonium- bzw. Cyanidionen klar zu Tage. Während die Paarungshemmung durch Cyanid gleich in voller Größe erscheint, prägt sich die Hemmung durch Ammonium erst im Laufe längerer Einwirkung voll aus (Abb. 8).

Bemerkenswert ist noch, daß beide Agenzien sich in ihrem hemmenden Einfluß - zumindest in den ersten 40 min - unabhängig voneinander auswirken (s. Abb. 8). Die Ausprägung der vollen Ammoniumhemmung scheint aber in Anwesenheit von $4{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol KCN doch etwas gehemmt.

3. Der Einfluß von Ammoniumionen auf die Atmung

Unter Einwirkung von NH_4Cl ist die Atmung von 4 Wochen alten ♀ erhöht. Je höher die zugegebene NH_4Cl-Konzentration ist ($3 \cdot 10^{-5}$...10^{-3} mol geprüft), desto stärker und länger wird die Atmung angehoben (Abb. 9 und 10). Während nach Zusatz von $3 \cdot 10^{-5}$ mol NH_4Cl bei $w_{\varphi} = (5...6) \cdot 10^{-3}$ die Atmung nach 30...60 min wieder auf den Grundwert abgefallen ist, wirkt 10^{-4} mol NH_4Cl etwa 90...120 min atmungssteigernd. Bei 10^{-3} mol NH_4Cl ist selbst nach 270 min die Atmung noch nicht auf den Wert der KCl-Kontrolle zurückgefallen. 10^{-3} mol KCl hat zwar auch atmungsstimulierende Wirkung, aber der Effekt ist kleiner als bei 10^{-4} mol NH_4Cl und im Gegensatz dazu über mehrere Stunden gleichmäßig.

Entsprechende Effekte erhält man auch bei den übrigen Klonen z. B. ♀ (Abb. 11).

Es muß noch bemerkt werden, daß der pH-Wert bei Versuchsende um so saurer war, je größer die zugegebene Ammoniummenge war (s. z. B. Legende der Abb. 10), ein Ergebnis, das bei Assimilation von Ammoniumhydroxyd zu erwarten ist.

4. Die Ammoniumassimilation

Abb. 14 gibt einen Versuch an ♀ (33 Tage-Kultur) wieder, bei dem die Aufnahme der Ammoniumionen aus dem Medium gemessen wurde. Man sieht, daß bei $w = 5{,}2 \cdot 10^{-3}$ eine Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4^+ nach etwa 100 min aus dem Medium resorbiert war. Bei einem zweiten Versuch an ♀ (29 Tage-Kultur) verlief die Ammoniumassimilation wesentlich langsamer (Abb. 15). Unter Einwirkung von $5 \cdot 10^{-5}$ mol KCN war sie stark gehemmt. Dies beweist die Beteiligung von Schwermetallwirkungsgruppen bei der Ammoniumassimilation.

Ganz entsprechend verhält sich der durch Ammoniumionen induzierte Atmungsanstieg: Unter Einwirkung von Cyanidkonzentrationen ($(1{,}5 \ldots 4{,}5) \cdot 10^{-5}$ mol), die auf die Grundatmung praktisch ohne Einfluß sind, reagieren die Zellen auf Zugabe von NH_4Cl nur mit einem teilweisen Atmungsanstieg; dieser bleibt aber über einen längeren Zeitraum erhalten (Abb. 12 und 13).

Auf Grund dieser Ergebnisse darf man annehmen, daß Stickstoffmangelzellen von C. eugametos und C. moewusii auch im Dunkeln bei erhöhtem oxydativen Stoffwechsel zur Ammoniumassimilation befähigt sind. Das Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit Befunden, die WETHERELL[156] an ♂ gemacht hat.

IX. Diskussion der Ergebnisse aus IV mit IX

TRAINOR[135] konnte zeigen, daß C. moewusii und C. eugametos in ihrem sexuellen Verhalten einige physiologische Unterschiede aufweisen. Auch FORSTER[38] und BERNSTEIN et al.[7] haben bereits

Hinweise hierfür erbracht. Daß solche Unterschiede bestehen, konnte bestätigt werden (IV 1); andererseits hat sich aber herausgestellt, daß alle 4 Klone prinzipiell auch im Dunkeln sexuell aktiv werden können. Es konnten darüber hinaus morphologische Differenzen aufgezeigt werden, die bei der Kultur auf KNOP-Agar in Erscheinung treten: Reservestoffspeicherung (IV 3) und Zellgröße (IV 2) sind bei beiden Formen als Funktion des Kulturalters verschieden. Trotz dieser Unterschiede erscheint es bedenklich , die beiden Formen C. eugametos und C. moewusii weiterhin als zwei getrennte Arten zu führen; vor allem nachdem durch Untersuchungen von BUFFALOE[23] für beide Formen haploid 8 Chromosomen nachgewiesen sind und GOWANS[47] für Kreuzungen zwischen C. eugametos und C. moewusii Rekombinationen für 5 getrennte Gene erhalten hat.

Im Zuge des verfolgten Hauptproblems, der Regulation der sexuellen Aktivität, sind einige methodisch wichtige Fragen bearbeitet worden (V...VII). Durch diese Untersuchungen ist es möglich geworden, bei gut reproduzierbaren hohen Gametenausbeuten mittels des quantitativen Paarungstestes die Bearbeitung difficilerer Fragen in Angriff zu nehmen.

Eine der ersten Aufgaben war es, den physiologischen Zustand der Zellen im Bereich des optimalen Kulturalters für die Auslösung der Sexualität (30 ± 5 Tage) näher zu charakterisieren. Es ließ sich zeigen, daß bei relativ jungen Zellen auf Zugabe von Ammoniumionen die sexuelle Aktivität abfällt, wogegen bei relativ alten Zellen durch Zugabe von Ammoniumionen eine Verbesserung der sexuellen Aktivität zu erzielen ist (VIII 1). Die Beeinflussung der sexuellen Aktivität durch Ammoniumionen ist dabei ein indirekter Effekt, der über die Assimilation (cyanidempfindlich) des Ammonium-Stickstoffes zustande kommt. Während der Dauer der Ammoniumassimilation ist die Atmung stark angehoben (VIII 3). Dies ist eine auffallende Parallele zu Befunden von HOLZER et al.[64] an Hefen. Die Autoren konnten zeigen, daß nach Zusatz von Ammoniumionen zu Glucose oxydierenden Hefezellen durch Einsetzen der $NADPH_2$ (= reduziertes Nicotina-

mid-adenin-dinukleotid-phosphat) verbrauchenden reduktiven Aminierung von α-Ketoglutarat zu Glutaminsäure eine Verschiebung des Glucoseabbaues vom Weg über Glykolyse und Citronensäurecyclus zum Weg des oxydativen Pentosephosphatcyclus stattfindet. Im Gegensatz zu Chlamydomonas ist aber bei den auf rasches Wachstum herausgezüchteten Kulturhefen die Kapazität des Atmungssystems bereits vor Zusatz von Ammoniumionen voll ausgelastet.und die Erhöhung des Kohlehydratdurchsatzes kann sich nur als Steigerung der aeroben Glykolyse äussern. Der gleiche Weg dürfte auch bei Pflanzen und Chlorella verwirklicht sein (s. SYRETT[133] und BAKER et al[4]). Es ist daher wahrscheinlich, daß auch bei Chlamydomonas die Ammoniumassimilation über diesen Weg erfolgt. Das würde bedeuten, daß die Regulation der sexuellen Aktivität durch Ammoniumionen eine Regulation der allgemeinen Syntheseleistung des Stoffwechsels ist, die im wesentlichen darauf beruht, daß durch das Angebot von Ammoniumsalzen der Pyridoxaminphosphat (PAM)- und Pentosephosphat-Spiegel der Zelle erhöht wird und damit die Voraussetzungen zur Synthese von Nukleinsauren und Einleitung von Wachstum und Zellvermehrung geschaffen werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dam die photoautotrophen Zellen im Dunkeln ihren Energiebedarf im Stoffwechsel ganz aus dem Reservestoff-"pool" decken müssen. Daß das Einsetzen der Ammoniumassimilation bei jungen reservestoffarmen, relativ stickstoffreichen Zellen einen Abfall der sexuellen Aktivität bewirkt, wird man daher auf einen erhöhten Verbrauch von "reducing power" ($NADPH_2$ $NADH_2$) und "energiereichen Phosphaten" (Adenosintriphosphat = ATP) im Intermediärstoffwechsel zurückführen müssen. Die Tatsache, daß bei relativ alten, reservestoffreichen Stickstoffmangelkulturen, im Gegensatz zu jungen, die sexuelle Aktivität durch Ammoniumassimilation verbessert wird, läßt darüberhinaus den Schluß zu, daß neben "energiereichen Phosphaten" und "reducing power" zur Synthese der sexuellen Affinität auch Stickstoff (PAM) notwendig ist. Die von verschiedenen Autoren beobachtete unterschiedliche Reaktion von C. eugametos und C. moewusii auf Zugabe von Ammoniumionen (s. I) wird somit aus der bei C. moewusii größeren Tendenz zur Reservestoffspeicherung (s. IV 3) und dem früheren Auftreten der sexuellen Aktivität (IV 1) verständlich.

Bedenkt man, daß der erste Schritt der Kopulation auf der Existenz von Gamonen mit Glykoproteidcharakter basiert, so wird man auf Grund der neueren Erkenntnisse von JACOB et al.[65] annehmen, daß die Gamonsynthese bei Chlamydomonas in ähnlicher Weise wie die Proteinsynthese bei Bakterien einer doppelten genetischen Kontrolle unterliegt. Dabei dürften neben den sogenannten Strukturgenen, die über die Synthese gewisser Enzyme die Molekularstruktur der Gamone bestimmen, noch Regulator- und Operatorgene von Bedeutung sein, über die die Gamonsynthese unter Beteiligung von cytoplasmatischen Komponenten oder Repressoren durch bestimmte spezifische Metaboliten inaktiviert oder aktiviert werden kann. Auf diese Weise scheint ein Regulationssystem möglich, welches mittels eines kurzlebenden Zwischenprodukts - der "messenger-RNA", die mit den Ribosomen, an denen die Proteinsynthese abläuft, reagiert - direkt auf der Basis der RNS-Synthese durch die Gene arbeitet. Unter diesem Gesichtspunkt wird man sich die Frage stellen, welches die spezifischen Metaboliten sind, durch die die Repressoren inaktiviert werden. Nach den bisherigen Ergebnissen kann diese Frage nicht beantwortet werden. Es scheint aber, daß durch einen ausbalancierten Zustand im Zellstoffwechsel, wobei ein bestimmtes Angebot von "reducing power", "energiereichen Phosphaten" und "einbaufähigem Stickstoff" bestehen muß die auslösende Gesamtsituation zur Einleitung der Synthese der sexuellen Affinität geschaffen wird. Dieser Zustand ist bei den hier verwendeten Anzuchtbedingungen nach rund 30-tägiger Kultur am besten verwirklicht. Es ist für die weiteren Untersuchungen sehr wesentlich, daß die Zellen in diesem Zustand über großes Reserve-"pool" in Form von Stärke und Öl (IV 3) verfügen und daß die an sich obligat photoautotrophen Organismen die Synthese der sexuellen Affinität auch im Dunkeln durchführen konnen (IV 1). Damit ergibt sich die Möglichkeit zu prüfen, ob sichtbare Strahlung neben dem Weg über die Photosynthese einen Einfluß auf die sexuelle Aktivität von C. eugametos und C. moewusii ausübt. Dies schien nach den Befunden von FORSTER[37,38] und STIFTER[130] bereits weitgehend gesichert. Von einer Identifizierung der beteiligten Photorezeptoren konnte man weitere Einblicke in den Reaktionsmechanismus der sexuellen Aktivierung erwarten.

X. Zur Dynamik der sexuellen Aktivierung

1. Dosis-Effekt-Kurven der sexuellen Aktivierung

Eine Analyse von Dosis-Effekt-Kurven liegt bislang nicht vor und wird nachfolgend an Ergebnissen von FORSTER[37], LEWIN[87] und eigenen versucht.

a) Methodik

Als Lichtquelle diente eine teilweise abgeschirmte Leuchtstofflampe der Fa. OSRAM vom Typ HNW 120, 25 Watt. Der Versuchsraum wurde bei dauernder Luftumwälzung auf 18 ± 0,1 °C konstant gehalten. Die Zellsuspensionen ($V_{\varnothing}$ = 4 cm^3, w = $(0{,}6...1{,}3)\cdot10^{-3}$; V_{φ} = 0,5 cm^3, w = $(11...20)\cdot10^{-3}$) wurden in Petrischalen (5 cm ø), die an Orten mit der gewünschten Beleuchtungsstärke E (in Lux) aufgestellt waren, gemischt und eine Stunde belichtet. Nach einer weiteren Stunde wurde fixiert. Die Auswertung erfolgte nach dem Paarungstest (s. III 5).

In der Regel beobachtet man einen Bruchteil (G_d) der Population, der sich schon im Dunkeln paart. Es kann dann nur der Teil G_p-G_d der Population eine Reaktion auf das Licht zeigen. Als Maß für die Wirkung des Lichtes steht daher - wenn G die bei einer bestimmten Dosis erhaltene Paarungsrate ist - allgemein die Größe

$$0 \leq \frac{G - G_d}{G_p - G_d} \leq 1.$$

b) Ergebnisse

In Abb. 16 sind die Ergebnisse einiger Versuche an ♀ graphisch dargestellt. In der Abszisse ist $D/D_{1/2}$ aufgetragen, wobei $D_{1/2}$ die Dosis ist (als Maß dient Lumenstunden/Quadratmeter = lm·h/m) für die $(G-G_d)/(G_p-G_d)$ = 1/2. Die Ordinate ist so geteilt, daß

die Funktion $F\ (G-G_d)/(G_p-G_d) = \log \frac{1}{1-(G-G_d)/(G_p-G_d)}$ eliminiert wird. Die ideale Eintrefferkurve ist zum Vergleich eingezeichnet. Sie folgt in diesem Fall der Gleichung $(G-G_d)/(G_p-G_d) = 1 - e^{-kD}$. Daraus erhält man durch einfaches Umformen und Logarithmieren:

$$e^{kD} = \frac{1}{1-(G-G_d)/(G_p-G_d)} \quad \text{bzw.} \quad kD = \log \left(\frac{1}{1-(G-G_d)/(G_p-G_d)} \right)$$

In dem Diagramm wird die Eintrefferkurve also durch eine Gerade gegeben, die durch die Punkte 0/0 und 1,0/50 geht. Mehrtrefferkurven dagegen sind nach oben gekrümmt. Als Beispiel ist eine ideale 5-Trefferkurve angegeben. Die gemessenen Dosis-Effekt-Kurven sind in keinem Falle mit einer idealen Trefferkurve vergleichbar.

Im Anlaufbereich weichen die Kurven mit $G_d > 0$ von der Eintrefferkurve in der Art ab, wie es für eine biologisch bedingte Variabilität der Trefferzahl zu erwarten ist. Das heißt, ein Teil der Population reagiert nach Absorption eines Quants, ein Teil nach Absorption von zwei Quanten u. s. w. Ist $G_d = 0$, so geht der Prozentsatz der Zellen, die nach Absorption eines Quants reagieren gegen Null, und der Anlaufast der Dosis-Effekt-Kurve zeigt den Charakter einer Mehrtrefferkurve (Material von LEWIN[87]). Andererseits wird mit ansteigenden Werten von G_d der nach Absorption von einem Quant reagierende Bruchteil der Population relativ groß und die Anlaufäste der Dosis-Effekt-Kurven entsprechen einer Eintrefferkurve. Die Bestimmung der nach einer POISSON'schen Verteilung variierenden wahrscheinlichsten Trefferzahl nach der von ZUPPINGER[161] angegebenen Methode gelingt jedoch nicht. Der Grund ist das allen Kurven gemeinsame starke Abknicken mit wachsender Dosis. Auch durch Annahme einer zusätzlichen normalen Variabilität der Treffbereiche, d. h. einer variierenden Zahl von Photorezeptormolekülen pro Zelle kann es nicht erklärt werden. Würde die bei Belichtung gebildete Substanz (= X), die darüber entscheidet ob die Zelle paarungsfähig ist oder nicht, jedoch laufend nach einer Reaktion 1. Ordnung abgebaut (Rückreaktion), so wäre die Diskrepanz verständlich. Das günstigste Raster für die Darstellung der Dosis-Effekt-Kurven ist daher das sogenannte Wahr-

scheinlichkeitsnetz (s. z. B. KOLLER[76] oder LINDER[88]). Erwartungsgemäß erscheinen die Dosis-Effekt-Kurven in diesem Netz als Geraden (s. Abb. 17). Man darf demnach annehmen, daß die Häufigkeiten der nach verschiedenen Trefferzahlen sexuell aktivierten Zellen um $G_p/2$ normal verteilt sind. Sehr wichtig ist die Tatsache, daß bei den von LEWIN[87] verwendeten Anzuchtbedingungen (8-tägige Kultur in DL) keine Dunkelgameten auftreten und die Halbwertsdosis für die sexuelle Aktivierung bei 500 lm·h/m^2 lag. Dagegen sind bei den hier verwendeten Anzuchtbedingungen (4-wöchige Kultur bei L:D = 14 h:10 h) ähnlich wie bei FÖRSTER[37,38] stets Dunkelgameten aufgetreten und die Halbwertsdosis für die sexuelle Aktivierung lag im Bereich 0,05...1,0 lm·h/m^2. Der Energiebedarf für die sexuelle Aktivierung war also bei LEWIN[87] 500...1000 mal so groß. Die Ursache für diese Diskrepanz dürfte wohl darin zu suchen sein, daß die Zellen nach 8-tägiger Kultur noch nicht über einen ausreichenden Reservestoff"pool" verfügen (vergl. IV 1 und 3), und deshalb eine stoffwechselphysiologische Leistung wie die sexuelle Aktivierung notwendig an den Ablauf der Photosynthese gebunden ist. Das wird durch das von LEWIN[87] für C. moewusii ermittelte Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung belegt: Es gleicht dem Absorptionsspektrum des Chlorophylls. Der geringe Energiebedarf zur sexuellen Aktivierung von reservestoffreichen 4 Wochen kultivierten Zellen weist demgegenüber auf die Beteiligung von mehr katalytisch wirksamen Photorezeptoren.

2. Der Abbau der sexuellen Aktivität

LEWIN[87] und FÖRSTER[37,38] haben an ♀, ⊖ und ♂ den Verlust der sexuellen Aktivität im Dunkeln nachgewiesen. LEWIN[87] hat bereits darauf hingewiesen, daß bei ♀ und ⊖ der Abbau nach einer Reaktion 1. Ordnung zu verlaufen scheint. Die von LEWIN[87] verwendete Darstellung läßt jedoch noch Zweifel bestehen, da er die Eigenschaften des biologischen Tests nicht berücksichtigt hat.

a) Methodik

Mit der Annahme, daß die Paarungshäufigkeiten bezüglich der Konzentration c des unbekannten Substrates oder Fermentes (= X), welches den Ablauf der Paarung kontrolliert, normal verteilt sind und d G/d c bei $G_p/2$ ein Maximum erreicht, folgt, daß $\Delta c \sim \Delta$Probit G/G_p oder allgemein

$$c = a \cdot \text{Probit } G/G_p + b \qquad (12)$$

Wird die durch Belichtung gebildete Menge des Kontrollsubstrates X nach einer Reaktion 1. Ordnung abgebaut, d. h. gilt

$$(c - c_d) = (c_o - c_d) \cdot e^{-kt} \text{ oder } \ln \frac{c_o - c_d}{c - c_d} = kt \qquad (13)$$

wobei c_d = Konzentration von X bei G_d, c_o = Konzentration von X zur Zeit t = 0, c = Konzentration von X zur Zeit t, k = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion, so ergibt sich in einem Diagramm mit log $(c_o - c_d)/(c - c_d)$ als Ordinate und t als Abszisse eine Gerade, deren Steigung $\alpha = k/2{,}303$ ist. Die Bestimmung von

$$\frac{c_o - c_d}{c - c_d} = \frac{\text{Probit } G_o/G_p - \text{Probit } G_d/G_p}{\text{Probit } G/G_p - \text{Probit } G_d/G_p} \qquad (14)$$

gelingt nur, wenn $G_p > G > G_d > 0$, da einerseits nicht notwendig für G = 0 auch c = 0 und andererseits für $G \rightarrow G_p$ der Wert von Probit $G \rightarrow \infty$. Zur Erhöhung der Genauigkeit wählt man für t_c einen Zeitpunkt für den G/G_p bereits auf einen Wert $\leq 0{,}9$ abgesunken ist, und definiert diesen als G_o/G_p.

b) Ergebnisse

In Abb. 18 sind die Daten von FÖRSTER[37] über den Abbau der sexuellen Aktivität bei ♂ - es standen die Daten aus dem Originalprotokoll zur Verfügung - nach Umformung gemäß (14) dargestellt. Die Punkte scharen sich um eine Gerade. Der bei ♂ im Licht gebildete Überschuß an X = $(c_o - c_d)$ verschwindet im Dunkeln also nach einer Reaktion 1. Ordnung. Aus eigenen Versuchen resultiert dasselbe Ergebnis für ♀ (s. Abb. 18).

Damit ist es möglich, auch die Daten von LEWIN[87] über die Rückreaktion bei ♀ und ♂, bei denen keine Angaben über G_d vorliegen, nach (14) zu analysieren, denn die Bedingung, daß $\log\left(\frac{\text{Probit } G_o/G_p - \text{Probit } G_d/G_p}{\text{Probit } G/G_p - \text{Probit } G_d/G_p}\right)$ gegen t aufgetragen eine Gerade durch den O-Punkt ergeben muß, ist hinreichend für die Bestimmung von Probit G_d/G_p. Ein auf diese Weise umgerechneter Versuch von LEWIN[87] ist ebenfalls in Abb. 18 eingetragen. Bei ♀ ließ sich die sehr begrenzte Rückreaktion nicht analysieren, da bei den hier verwendeten Kulturbedingungen meist schon über 80 % der potentiellen Gameten im Dunkeln paarungsfähig sind (s. a. FÖRSTER[37], FÖRSTER et al.[39]).

Nach (13) läßt sich der Wert für die Geschwindigkeitskonstanten k der Rückreaktion formell ermitteln. Ordnet man den gefundenen Geschwindigkeitskonstanten in der Ordinate den reziproken Wert der zugehörigen absoluten Temperatur als Abszisse zu, so ergibt sich für ♀ eine Gerade (Abb. 19). Die aus dem weiteren Material von LEWIN[87] berechenbaren k-Werte sind mit großen Fehlern behaftet, jedoch prinzipiell mit der Geraden zu vereinbaren. Dies entspricht der Erwartung, daß die Geschwindigkeitskonstante k der Rückreaktion von den verschiedenen Anzuchtbedingungen nicht beeinflußt wird. Der Tabelle 1 von LEWIN[87] kann man entnehmen, daß die Geschwindigkeitskonstante für den Abbau von X in dem untersuchten Temperaturbereich von 10...35 °C bei ♂ kleiner ist als bei ♀. Noch ausgeprägter ist der Unterschied bei C. eugametos. Aus Abb. 19 folgt für $k_{18°♂} = 1{,}8 \cdot 10^{-3}$ sec^{-1}, wogegen $k_{18°♀} = 4{,}2 \cdot 10^{-4}$ sec^{-1}, d. h. $k_♂ > k_♀$. ♀ dagegen zeigen bei Zimmertemperatur praktisch keine Rückreaktion (s. o.). Damit ist aber bei 18 °C $k_♀ < k_♂$ oder fortlaufend: $k_♀ < k_♂ < k_♀ < k_♂$. Dies ist gleichbedeutend mit der Aussage über die Halbwertszeiten* des Kontrollsubstrates X: $\tau_♀ > \tau_♂ > \tau_♀ > \tau_♂$. Die Geschwin-

*Diese Halbwertszeiten, die den Geschwindigkeitskonstanten umgek proportional sind, können mit den von FÖRSTER[37] und LEWIN[87] ang benen Halbwertszeiten nicht verglichen werden, denn diese sind b logisch definiert und geben an, nach welcher Zeit die Hälfte ei bestimmten durch Licht aktivierten Prozentsatzes von Gameten zu reagiert hat.

digkeitskonstanten des Abbaues der sexuellen Aktivität von ⊕, ⊖, ♂ und ♀ sind also bei 18 °C deutlich verschieden. Nimmt man an, daß die Klone unter gleichen Bedingungen gleich viel von dem Kontrollsubstrat X synthetisieren, so müßten sich die unterschiedlichen Halbwertszeiten von X in einer unterschiedlichen Tendenz zur Paarung widerspiegeln. Dies trifft auch tatsächlich zu (s. IV 1).

Aus dem Temperaturgang der Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion, d. h. aus der Neigung der Geraden im Abb. 19, läßt sich nach ARRHENIUS (zitiert nach NETTER[107]) mittels der Gleichung

$$\frac{d \log k}{d\, 1/T} = -\frac{1}{4{,}57} \cdot \mu \qquad (15)$$

die Aktivierungswärme μ für den Abbau von X bei ⊕ bestimmen. Man findet für $\mu_{X\oplus} = 4{,}57 \frac{10^3}{3{,}53-3{,}24} = 15{,}8$ kcal. Nach den Daten von LEWIN[87] zu schließen, ist der Temperaturgang der Geschwindigkeitskonstanten bei ⊕ und ⊖ etwa gleich. Auch für ♂ folgt aus den Angaben von FÖRSTER[37] eine gleichsinnig starke Temperaturabhängigkeit der Rückreaktion. Eine Aktivierungswärme von rund 16 kcal, wie sie im vorliegenden Fall in Erscheinung tritt, ist für biologische Prozesse häufig gefunden worden und wird meist als ein Hinweis dafür gewertet, daß die Oxydation von Fe^{++} zu Fe^{+++} Schrittmacherfunktion im System ist (s. CROZIER[26] und HOAGLAND[63]).

FÖRSTER et al.[40] haben einige Angaben über die Temperaturbeständigkeit der isolierten Andro- und Gynogamone von C. eugametos gemacht. Diese Angaben gestatten eine Abschätzung des Temperaturkoeffizienten (= Q_{10}) für die Inaktivierung der Gamone. Für das Androgamon ergibt sich aus dem Temperaturintervall von 30...40 °C ein $Q_{10} \approx 5$. Das Gynogamon zeigt im Intervall 65...75 °C einen $Q_{10} \approx 2{,}3$. Mit der Beziehung (s. AEBI[1] oder JOHNSON et al.[68]):

$$\mu = 0{,}457 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot \log Q_{10} \qquad (16)$$

errechnet sich daraus für $\mu_{♂\text{-Gamon}} \approx 30$ kcal und für $\mu_{♀\text{-Gamon}} \approx 20$ kcal. Es ist also $\mu_{\text{Gamon}} > \mu_X$. Dieses Ergebnis ist auch dann zu erwarten, wenn die Gamone die Substrate sind, die darüber entscheiden, ob eine Zelle paarungsfähig ist oder nicht, denn im allgemeinen wird in vivo die Aktivierungswärme durch

durch die Anwesenheit von Fermenten stark erniedrigt. Es bleibt also denkbar, daß die Gamone mit den Kontrollsubstraten X identisch sind und die verschiedenen Halbwertszeiten der sexuellen Aktivität (τ -Werte) die unterschiedliche Stabilität der Gamone repräsentieren. Zur Klärung dieses Punktes wäre es wertvoll, die τ - und μ -Werte der isolierten Gamone mit den τ -und μ-Werten der in vivo gemessenen Rückreaktionen bei allen vier Klonen zu vergleichen. Das scheitert vorerst daran, daß für die agglutinierende Wirkung der Gamone kein quantitativer Test bekannt ist*. Nach den bisherigen Erfahrungen (FÖRSTER et al.[40]) ist das ♀-Gamon wesentlich stabiler als das ♂-Gamon. Dies entspricht sehr gut der Tatsache, daß bei ♀ nur eine sehr begrenzte Rückreaktion auftritt, wogegen bei ♂ ein schneller Abbau der sexuellen Aktivität erfolgt.

3. Das Synthesegleichgewicht

Löst man (13) nach c auf: $c = c_d - (c_d - c_o)e^{-kt}$, differenziert nach t:

$$\frac{d\,c}{d\,t} = k \cdot e^{-kt}\,(c_d - c_o), \qquad (17)$$

und setzt (13) ind(17) ein, so erhält man:

$$\frac{d\,c}{d\,t} = k \cdot c_d - k \cdot c = C - k \cdot c. \qquad (18)$$

Dies ist aber die Gleichung für ein offenes arbeitsfähiges chemisches System:

$$Y \ldots \xrightarrow{k'} \ldots X \ldots \xrightarrow{k} \ldots A, \qquad (19)$$

*Inzwischen hat sich die Möglichkeit zur Entwicklung eines quantitativen Tests auf Gamone ergeben. Dabei bedient man sich der Tatsache, daß der Ablauf der Paarung in einem gamonhaltigen Medium verzögert wird. So erhält man z. B. in einem Ansatz mit ♂ im Unterschuß gegenüber ♀, nach Zugabe von Gynogamon bei Inkubationszeiten bis etwa 1 h geringere Paarungsraten, da ein Teil der ♂ durch Isoagglutination der Paarung mit ♀ entzogen wird.

bei dem die Konzentration der Komponente X = c durch eine konstante Zufuhr d c/d t = k' · c' = C = k · c_d, wobei c'= konstant und durch eine Abbaugeschwindigkeit gemäß einer Reaktion 1. Ordnung - d c/d t = k · c bestimmt wird. Der sich einstellende Dunkelzustand, in dem

$$k \cdot c = k' = k \cdot c_d = C, \qquad (20)$$

ist daher kein echtes, ruhendes, thermodynamisches (statisches) Gleichgewicht, sondern es wird unter Aufwendung von Energie ein ausgeglichener Zustand (steady state) erzwungen, der als "dynamisches" oder "Fließgleichgewicht" (BERTALANFFY[8]) zu bezeichnen ist. Unter Verwendung von (12) und (20) kann man die Zufuhr C ausdrücken als:

$$C = k\,(a\ \text{Probit}\ G_d/G_p + b) = k \cdot a\,(\text{Probit}\ G_d/G_p + b/a) \qquad (21)$$

und, sofern die Größe b/a bekannt ist, mit der Beziehung (s. z. B. AEBI[1]):

$$\mu = \frac{4{,}575}{(1/T_1 - 1/T_2)} \cdot \log \frac{C_2}{C_1} \qquad (22)$$

die Aktivierungsenergie für die Schrittmacherreaktion in der Zufuhr- oder Synthesekette für X bestimmen. Zur Bestimmung von b/a geht man von der Annahme aus, daß in dem untersuchten Temperaturbereich die Schrittmacherreaktion nicht wechselt, d. h. die Aktivierungsenergie konstant ist. Aus (22) formuliert sich dann für drei verschiedene Temperaturen

$$(1/T_2 - 1/T_3) \log \frac{C_2}{C_1} = (1/T_1 - 1/T_2) \log \frac{C_3}{C_2} \qquad (22')$$

und nach Einsetzen von (21):

$$(1/T_2 - 1/T_3) \log \frac{k_2\,(\text{Probit}\ G_{d2}/G_p + b/a)}{k_1\,(\text{Probit}\ G_{d1}/G_p + b/a)} =$$

$$(1/T_1 - 1/T_2) \log \frac{k_3\,(\text{Probit}\ G_{d3}/G_p + b/a)}{k_2\,(\text{Probit}\ G_{d2}/G_p + b/a)}\,. \qquad (23)$$

Proben der bei 20 °C angesetzten Zellsuspensionen wurden 30 min vor dem Mischen der Geschlechter auf die gewünschten Temperaturen gebracht. Eine Stunde nach dem Mischen wurde fixiert. Parallelansätze wurden zur Bestimmung von G_p mit Kulturinten-

sität belichtet. In Tab. 4 sind neben einer Meßreihe bei ♂ die aus 4 Versuchen für ♀ ermittelten Probit G_d/G_p-Werte mit zugehörigen Temperaturen und Geschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion (k, entnommen aus Abb. 19) angegeben. Mit diesen Angaben errechnet sich b/a aus (23) über Lösung der Gleichung:

$$\log 1{,}66\,\frac{4{,}89 + b/a}{5{,}56 + b/a} = 1{,}87 \log 1{,}32\,\frac{4{,}09 + b/a}{4{,}89 + b/a} \quad (23'$$

Diese transzendente Gleichung für b/a läßt sich nur durch Probieren lösen. Sie hat eine reelle Lösung; diese liegt bei b/a = 62,4. Hiermit errechnet sich aus (21) und (22) die Aktivierungsenergie für die Zufuhr C bei C. moewusii ♀ zu $\mu_{C♀}$ = 15,0 kcal. Die Synthese von X wird also durch eine Reaktion mit einer Aktivierungsenergie von 15 kcal kontrolliert. Dadurch ist erwiesen, daß der Aufbau der sexuellen Aktivität nicht allein aus einem photochemischen Primärprozeß, der eine Aktivierungsenergie gegen O kcal haben muß, bestritten werden kann. Es ist also ausgeschlossen, daß eine spezifische Vorstufe von X durch Absorption eines Quants in das reaktionsfähige, den Ablauf der Paarung kontrollierende Substrat umgewandelt wird.

Obwohl das System mit Zunahme der Temperatur ein Abfallen des Dunkelgametentiters d. h. eine Abnahme der Leistung zeigt, ist dies also nicht notwendig auf eine exotherme Reaktion zu beziehen. Es liegen vielmehr zwei den Gesamtvorgang in entgegengesetzter Richtung bestimmende Prozesse vor, wobei der Einfluß der Temperatur auf den abbauenden Prozeß größer ist ($\mu_{X♀}$ = 15,8 kcal) als auf den aufbauenden Prozess ($\mu_{C♀}$ = 15,0 kcal). Bei Einstrahlung hoher Lichtintensitäten (> 800 Lux) verschwindet der "exotherme Charakter" des Systems. Man findet dann mit zunehmender Temperatur ein Anwachsen der Paarungsrate (s. Tab. 4). Unter diesen extremen Bedingungen übernimmt offensichtlich eine stärker temperaturabhängige Reaktion die Schrittmacherfunktion in der Synthesekette. Das bedeutet, daß die Schrittmacherfunktion für die Synthese von X unter verschiedenen Bedingungen von verschiedenen Substraten oder Fermenten ausgeübt werden kann. Die Konzentration von X (= c) muß daher

als Funktion mehrerer Variabler betrachtet werden : $c = f(k_1 \ldots k_n)$. Die Situation ist also ähnlich wie bei der Nettoassimilation der pflanzlichen Organismen, d. h. der Summe von Assimilations- und Atmungsleistung. Sie nimmt bei schwacher Lichtintensität mit der Temperatur ab, bei stärkerer zu: Die Neubildung der Assimilate durch die Assimilation wächst hier mit der Temperatur schwächer als ihre Veratmung. Bei hohen Lichtintensitäten im Gebiet der Sättigung zeigt die Assimilation jedoch ein stärkeres Anwachsen mit der Temperatur (BLACKMAN'sche Reaktion, s. WARBURG[142]) als die Atmung (ausführliche Diskussion bei PRECHT et al.[112]).

Da b/a nun bekannt, läßt sich (12) für C. meowusii ⊕ spezieller formulieren als:

$$c_{\oplus} = a \,(\text{Probit } G/G_p + 62{,}4) \qquad (24)$$

Das heißt aber; Sind in einer Population praktisch keine Gameten vorhanden, so kann die Konzentration des Kontrollsubstrates X trotzdem sehr beträchtlich sein. Für $G/G_p \approx 10^{-7}$ ist Probit $G/G_p \approx 0$ und somit immer noch $c_{\oplus} = a \cdot 62{,}4$. Es wäre also denkbar, daß die Kontrollfunktion über die Bildungsgeschwindigkeit von X und damit über die Kopulation von einem Substrat ausgeübt wird, welches generelle Bedeutung für den Stoffwechsel der Chlamydomonaszelle besitzt. Nur bei besonders hoheh Konzentrationen dieses Substrates ist die Chlamydomonaszelle paarungsfähig.

4. Zur Frage der Gültigkeit des Reizmengengesetzes

Nimmt man an, daß die sexuelle Aktivierung der Chlamydomonaszelle durch Licht über eine Erhöhung der Zufuhr des Kontrollsubstrates X erfolgt, so darf man nicht erwarten, daß, gemessen an der Paarungsrate, das Reizmengengesetz gilt. Wird nämlich die Konzentration von X durch das in Gleichung (18) und (19) beschriebene Fließgleichgewicht bestimmt, so ist bei Einstrahlung geringer Intensitäten für entsprechend lange Zeit eine viel schlechtere Wirkung zu erwarten, als bei Verabreichung

der gleichen Dosis in kürzerer Zeit bei mittlerer Intensität, da eine Anhäufung von X durch die laufend erfolgende Abbaureaktion verhindert wird. Da andererseits die Reizbeantwortung bei sehr hohen Intensitäten einem Grenzwert zustrebt (G_p) und in der Regel auch eine gewisse Wirkungsdauer des Reizes (Sensitivierungsdauer) notwendig ist, sollte mit zunehmend kurzzeitigerem Einstrahlen höher werdender Intensitäten ein Abfall der Wirkung auftreten. Zur Prüfung dieses Tatbestandes habe ich Versuche folgender Art gemacht: Proben einer ♂- bzw. ⊕-Suspension wurden mit voll aktiven ♀ in Petrischalen (5 cm ø) gemischt und erhielten von einer Leuchtstofflampe (HNW 120) bei variierter Intensität und Zeit die gleiche Dosis an Weiß-Licht. 1 h nach Beendigung des längsten Bestrahlungsprogramms wurden die Proben fixiert. Aus Parallelproben, die 2 h bei Kulturintensität bzw. während der Gesamtzeit im Dunkeln gehalten waren, wurde G_p bzw. G_d bestimmt. Die Ergebnisse von einigen repräsentativen Versuchen sind in Abb. 20 festgehalten. Sie bestätigen die gemachte Voraussage und damit auch den angenommenen Reaktionsmechanismus.

XI. Endodiurnal gesteuerte Schwankungen der sexuellen Aktivität

1. Die Entdeckung der endogenen Rhythmik und ihr Temperaturkoeffizient

Zur Bearbeitung gewisser Fragestellungen ist es wertvoll, einen niederen, bei anderen wiederum einen hohen Prozentsatz an Dunkelgameten zu erhalten. FÖRSTER[37] hat eine Methode angegeben, mit der es möglich sein soll, den Dunkelgametentiter von Chlamydomonas zu regulieren. In Agarkulturen, einige Tage tieferen Temperaturen ausgesetzt und dann bei höheren Temperaturen suspendiert, soll ein hoher Prozentsatz an Dunkelgameten auftreten. Umgekehrt soll beim Übergang von höheren zu tieferen Temperaturen ihre Bildung unterdrückt werden. Bei der Nachprüfung der Wirksamkeit dieser Methode fand ich von der Tageszeit abhängig teils bestätigende, teils widersprechende Er-

gebnisse. Es schien daher sinnvoll, den Tagesverlauf des Dunkelgametentiters an kälte- bzw. wärmevorbehandelten Kulturen zu verfolgen. Das Ergebnis ist in Abb. 21 dargestellt. Es zeigt, daß bei ♂ und ♀ ein tagesrhythmisches Schwanken des Dunkelgametentiters vorliegt. Die starke Dämpfung im Dauerdunkel (DD) ist bei den streng photoautotrophen Flagellaten zu erwarten und für die weitere Analyse der Rhythmik durchweg erschwerend.

Um zu klären, ob auch bei ♀ ein tagesrhythmisches Schwanken des Dunkelgametentiters vorliegt, genügt folgendes Experiment: ♀, die sich durch inverse Anzuchtrhythmik unterscheiden, wurden mit der gleichen ♀-Kultur, deren rhythmisches Verhalten bekannt ist, getestet (Abb. 22). Die auftretenden Unterschiede in den An- und Abstiegsphasen sind ein Hinweis für Aktivitätsschwankungen bei den ♀. Es ist der Schluß möglich, daß jeweils in das Tagende ein Aktivitätsminimum fällt. Eine genaue Analyse (Abb. 23) ergibt, daß zwar die Aktivitätsminima deutlich ausgeprägt sind und ungefähr 12 h nach Belichtungsbeginn auftreten, daß aber die Aktivitätsmaxima gespalten sind. Das Hauptmaximum fällt in das Nachtende. Ein steiler Abfall führt zu einem angeschulterten Nebengipfel, der sich über den Tag erstreckt. Bei dem dritten Maximum erscheint der Nebengipfel nicht mehr, da die Konzentration des regulierten Kontrollsubstrates X - offenbar aus energetischen Gründen - zu klein bleibt.

Daß bei ♀ bezüglich des rhythmischen Verhaltens ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei ♀ und ♂, wird durch den Versuch der Abb. 24 demonstriert. ♀ und ♀, im inversen L:D-Wechsel angezüchtet, wurden jeweils bei Tagende ausgelöst und zweistündlich im Verhältnis 1:1 zur Reaktion gebracht. Der beobachtete Verlauf von P/E ist zweifelsohne die bei Überlagerung beider Rhythmen resultierende untere Begrenzungslinie. Das bedeutet aber, daß ♀ auch eine gut ausgeprägte endodiurnale Rhythmik mit Maxima bei Tagesbeginn und Minima etwa 12 h später besitzt. Gleichzeitig folgt daraus, daß für den Ablauf der Paarung sich beide Partner in einem ganz bestimmten physiologischen Zustand befinden müssen. Es genügt offenbar nicht, wenn nur ein Partner sexuell aktiviert ist (s. a. VII). Damit wird sehr unwahrschein-

lich, daß eine termonartige Wechselwirkung zwischen den Geschlechtern besteht.

Aus den meisten Kurven ergibt sich,daß das System unter den hier verwendeten konstanten Bedingungen (20 °C, DD) mit einer Periodenlänge von < 24 h schwingt. Dies ist ein Beweis für den endogenen Charakter des Systems. Daß der L:D-Wechsel auch bei Chlamydomonas als Zeitgeber für die endogene Rhythmik fungiert. ist durch die Tatsache bewiesen, daß sich die Dunkelgametenrhythmik bei Gabe eines inversen L:D-Wechsels um etwa 12 h verschiebt. Für die im folgenden Teil der Arbeit untersuchten Fragen ist es nicht von Bedeutung, die Zeitdauer für die Anpassung an den inversen Licht-Dunkel-Wechsel zu kennen. Es genügt zu wissen, daß nach 25 ± 5-tägiger Kultur unter den oben angegebenen Standardbedingungen die Dunkelgametenrhythmik dem während der Kultur gebotenen L:D-Wechsel (12 h:12 h oder 14 h:14 h voll angepaßt ist.

Die in einigen Versuchen (Abb. 21) angewendete 48-stündige (= t_k) Dunkelbehandlung mit 15 (= T_1) bzw. 24 (= T_2) °C vor dem Auslösen der Sexualität bewirkt eine Phasenverschiebung der Rhythmik um 3...4 h (= t_p). Eine ein- oder dreitägige Vorbehandlung hat entsprechend kleinere bzw. größere Phasenverschiebungen zur Folge. Auffallend ist, daß bei dem kalt vorbehandelten Material die Dunkelgametenmaxima eine Tendenz zur Aufspaltung zeigen, wogegen bei dem warm vorbehandelten Material ein Schärfungseffekt auftritt. Vernachlässigt man die Tatsache, daß die erste Periode nach dem Temperaturwechsel eventuell durch diesen beeinflußt sein kann (s. hierzu BÜNNING[2]) so errechnet sich nach

$$Q_{10} = \left(\frac{t_k + t_p}{t_k}\right)^{\frac{10}{T_2 - T_1}} \qquad (25)$$

der Temperaturkoeffizient für die Dunkelgametenrhythmik bei Chlamydomonas zu Q_{10} = 1,08 ± 0,02. Die Periodenlänge der Rhythmik wird also von der Temperatur nur geringfügig beeinflußt. Dies ist für zahlreiche tagesperiodische Prozesse bei den verschiedensten Organismen, vom Flagellat (BRUCE et al.[16])

bis zum Säugetier (RAWSON[115]) gefunden worden. SWEENEY et al.[132] haben die Ergebnisse über den Einfluß der Temperatur auf die diurnalen Rhythmen neuerdings im Zusammenhang diskutiert. Da in Extremfällen Temperaturkoeffizienten von Q_{10} = 0,8 und Q_{10} = 1,2 erreicht werden, ist man geneigt, den Mechanismus der endogenen Rhythmen als eine komplexe Verzahnung von Prozessen mit unterschiedlichen Temperaturkoeffizienten zu erklären. Der Befund von BRUCE et al.[17], wonach die Periodenlänge der Rhythmik unter Einfluß von schwerem Wasser (= D_2O) vergrößert wird, spricht sehr für die Beteiligung von Stoffwechselprozessen am eigentlichen Zeitmeßprozeß.

2. Der Einfluß des Suspendierzeitpunktes auf die Phasenlage der Rhythmik

Die Untersuchung von im 12 h:12 h L:D-Wechsel angezüchtetem Material, bei welchem zu verschiedenen Zeiten die Sexualität ausgelöst wurde (Abb. 25) zeigt, daß die Zeit der Auslösung auf die Lage der Maxima praktisch keinen Einfluß hat. Sie fallen mit dem ursprünglichen Tagesbeginn der Anzuchtrhythmik zusammen. Das entspricht Ergebnissen, wie sie von anderen Objekten her, z. B. für die Luminszensrhythmik von Gonyaulax polyedra (SWEENEY et al.[131]) bekannt sind.

3. Der Einfluß kurzzeitiger Kältebehandlungen auf die Phasenlage der Rhythmik

Aus einigen Arbeiten - diskutiert bei RUDDAT[120] - ist bekannt, daß im Falle des Vorliegens eines endodiurnal gesteuerten Systems dieses auf Abkühlen in bestimmten Phasen (Spannungsphasen des Oscillators) mit einer Verzögerung in anderen Phasen (Entspannung) dagegen mit keiner Verzögerung, sondern unter Umständen sogar mit einer Beschleunigung antwortet. Die Abb. 26 zeigt, daß bei ⊕ nach Überführung ins DD bereits durch eine einmalige Abkühlung auf 14 °C während der ursprünglichen Tagesstunden eine Phasenverzögerung der Rhythmik erzielt wird. Ein ein-

maliges Abkühlen während der Nachtstunden hingegen hat eher ein geringfügig verfrühtes Auftreten der Gametenmaxima zur Folge. Die energetische Spannungsphase des Oscillators fällt demnach mit der Lichtphase, also mit dem Dunkelgametenabfall zusammen.

Eine 6-stündige Abkühlung auf 4 °C bleibt zu allen Tageszeiten ohne Einfluß auf die Phasenlage der Rhythmik (s. Abb. 27). Es ist also offenbar ähnlich wie bei Oedogonium (RUDDAT[120]) bei Anwendung 6-stündiger Abkühlung eine noch niedrigere Temperatur notwendig, um eine Phasenverschiebung zu erhalten. Andererseits ist durch die Abkühlung in der zweiten Nachthälfte (Abb. 27) jedoch eine Erhöhung der nachfolgenden Gametenmaxima zu erzielen. Eine Erklärung hierfür ist vielleicht, daß gewisse Substrate, die normalerweise in den späten Nachtstunden umgesetzt werden und von deren Umsatz die sexuelle Aktivierung abhängt, nur zum Teil verbraucht werden und somit nach Auslösung der Sexualität in den Nachtphasen in höherer Konzentration zur Verfügung stehen.

4. Das rhythmische Verhalten von Dauerlichtkulturen und Versuche zur Auslösung der Rhythmik

Es ist ein lang bekanntes Faktum, daß Pflanzen oder Tiere, die unter konstanten Bedingungen angezogen werden, häufig zunächst keine Periodik zeigen. Aber es genügt,dann oft ein Einzelreiz, um die Rhythmik auszulösen. (BÜNNING[18,19,20,21], WASSERMANN[155]). Das Einschieben einer Dunkelperiode in Dauerlicht kann diese Wirkung haben, ebenso der Übergang von Dauerlicht zu Dauerdunkel.

Züchtet man Chlamydomonaszellen bei konstantem Dauerlicht und konstanter Temperatur, so zeigen sie nach Auslösen der Sexualität und Überführung ins DD keine (♂) oder ein nur schwach ausgeprägtes (♀) tagesrhythmisches An- und Abschwellen des Dunkelgametentiters (Abb. 28). Der Übergang von Dauerlicht zum Dauerdunkel reicht also für eine Synchronisierung oder ein Anstoßen der endogenen Rhythmik nicht ganz aus. Es liegt nahe, durch Einschieben von Dunkelperioden in Dauerlicht vor dem Auslösen bes-

seres Schwingen zu erreichen. Der Versuch der Abb. 28 a zeigt, daß bei ♂ eine Überführung vom DL ins DD 12 h vor dem Auslösen praktisch keinen Einfluß auf den Verlauf des Gametentiters hat. Er bleibt weiterhin disrhythmisch, so als ob Überführung ins DD und Auslösung gleichzeitig erfolgt wären. Bei ♀ dagegen (Abb. 28 b) führen die beiden Behandlungen zu einem deutlich ausgeprägten Unterschied. Fallen Auslösung und Verdunklungszeitpunkt zusammen, so erscheint eine schwach ausgeprägte Rhythmik mit Maxima etwa 6 h nach der Auslösung. Wird die Kultur schon 12 h vor dem Suspendieren ins DD gebracht, so erscheint eine gut ausgeprägte, um 12 h verschobene Rhythmik in den Dunkelgameten. Beginnt das DD 6 h vor dem Suspendieren (Abb. 29), so verhält sich die Kultur ausgesprochen disrhythmisch. Dieses Ergebnis erlaubt den Schluß, daß die Überführung vom DL ins DD als Anstoß für die Rhythmik wirkt und zugleich die Phasenlage der Rhythmik fixiert, daß aber auch dem Suspendieren eine ähnliche Funktion, jedoch weniger stark, zukommt. Erfolgen Auslösung und Überführung ins DD gleichzeitig, so wirken beide Faktoren antagonistisch, d. h. die Rhythmik ist schwach ausgeprägt. Liegt die Überführung ins DD dagegen 12 h vor dem Auslösungszeitpunkt, so wirken beide Faktoren synergistisch und die Rhythmik erscheint stark ausgeprägt.

Unterbricht man das DL durch 1 h D, gibt wieder 23 bzw. 11 h L und überführt dann nach dem Suspendieren der Zellen ins DD, so ist die Rhythmik im ersten Fall gegenüber der Kontrolle signifikant verbessert (Abb. 30). Im zweiten Fall ist eher eine verschlechternde Wirkung festzustellen. Das kommt auch in der im Fall eins deutlich verbesserten Lichtaktivierbarkeit (12...14 h nach dem Suspendieren gemessen) zum Ausdruck. Dieses Verhalten weist darauf hin, daß auch im DL schon ein schwaches, eventuell nicht im 24-h-Rhythmus erfolgendes Schwingen des Oscillators um eine Mittellage erfolgen kann und, daß der Oscillator durch günstig liegende D-Stöße aufgeschaukelt wird. Es könnte sich jedoch auch um einen reinen Synchronisierungseffekt handeln.

5. Das rhythmische Verhalten der Einzelzellen nach Dauerlichtkultur

Das System bietet noch eine einfache Möglichkeit zur Bearbeitung der hier angeschnittenen entscheidenden Frage (BÜNNING[2]). Es ist die Frage, ob sich der Oscillator auch bei Normaltemperaturen in einer Ruhelage befinden kann, oder ob diese nur durch das phasenverschobene unabhängige Oscillieren der Einzelzellen vorgetäuscht wird. Nach den Untersuchungen von WASSERMANN[155] sind bei Vicia faba und Phaseolus multiflorus die Einzelzellen im Dauerlicht frei von tagesperiodischen Oscillationen.

Durch 2-stündige Ansätze, über den Tag verteilt, erhält mann bei Chlamydomonas eine Verlaufskurve für den Dunkelgametentiter. Inkubiert man dagegen einen Ansatz über einen längeren Zeitraum, so erfaßt man alle Zellen, die während dieser Zeit irgendwann paarungsfähig waren. Falls also während verschiedener Zeiten verschiedene Zellen paarungsfähig werden, d. h. die Einzelzellen unabhängig phasenverschoben oscillieren, müßte die über den langen Zeitraum gemessene Paarungsrate deutlich höher sein als der größte im gleichen Zeitraum aus 2-h-Versuchen erhaltene Wert. Dies trifft jedoch nicht zu (Abb. 28 a und Abb. 30). Der in Langzeitinkubationen erfaßte Gametentiter liegt so hoch wie der in diesen Zeitraum fallende höchste 2-h-Wert. Das heißt aber, daß die Population synchronisiert ist. Für den Versuch der Abb. 28 a folgt damit, daß die Einzelzellen frei von Oscillationen waren. Bei dem Versuch der Abb. 30 hingegen schwingt die Population synchron. Es fragt sich nur, wie es neben den im 24-h-Abstand auftretenden Hauptgipfeln noch zur Ausprägung von zwischengefügten Nebengipfeln kommt.

6. Tagesperiodische Schwankungen der Lichtempfindlichkeit

Da die Chlamydomonaszellen durch Licht sexuell aktivierbar sind, erhebt sich natürlich sofort die Frage, ob eventuell auch tagesperiodische Schwankungen in der Lichtaktivierbar-

keit auftreten. Für die der Abb. 21 zugrundeliegenden Versuche ist daher in Parallelansätzen, die während der Reaktionszeit bei 110 bzw. 480 Lux inkubiert waren, die Lichtaktivierbarkeit erfaßt worden. Das weiße (HNW, HNI) Licht hat durchweg fördernde Wirkung. Es besteht eine gewisse Parallelität zwischen dem Verlauf der Dunkel- und Lichtgametentiters. Die Lichtinduzierbarkeit erreicht jedoch erst gegen Tagesmitte ihr Maximum. Außerdem fallen Nebengipfel oder Schultern auf (mit ↓ gekennzeichnet), die in die Abendstunden fallen.

7. Diskussion der Ergebnisse aus XI.

Nach den vorstehenden Ergebnissen kann kein Zweifel darüber bestehen, daß die sexuelle Aktivität bei C. eugametos und C. moewusii durch ein endodiurnales System gesteuert werden kann. Damit ist ein weiteres Beispiel für die Existenz des Prinzips der "inneren Uhr" auf der Entwicklungsstufe des Einzellers erbracht (s. HASTINGS[53]). Für die weitere Bearbeitung des Problems der sexuellen Aktivierung von Chlamydomonas ist die Kenntnis der endogenen Rhythmik eine wesentliche Voraussetzung. Widersprüchliche Ergebnisse verschiedener Autoren werden als Folge der Unkenntnis der Rhythmik verständlich. Teilweise wird es nötig sein, frühere Ergebnisse unter dem Gesichtspunkt der endodiurnalen Oscillationen nachzuprüfen, vor allem, wenn die Autoren die Zellen in L:D-Wechsel angezüchtet haben und als Voraussetzung für ihre Versuche - wie z. B. STIFTER[130] - eine über mehrere Stunden konstante Reaktionsfähigkeit des Materials annahmen.

Die Oscillationen der sexuellen Aktivität können nicht als Folge von endodiurnal gesteuerten Zellteilungen erklärt werden, denn durch die Untersuchungen von LEWIN[85] bzw. WETHERELL[156] ist gesichert, daß bei teilungsreifen Zellen von C. moewusii bzw. C. eugametos nur in den ersten 12 h nach Überführung ins DD noch Teilungen ablaufen. Auch Schwankungen der Azidität des Mediums dürften für die diurnalen Aktivitätsschwankungen der Sexualität nicht von Bedeutung sein (s. Abb. 33).

Einen Ansatz für eine Arbeitshypothese zur Erklärung der Regulation der sexuellen Aktivität durch die innere Uhr liefert die Beobachtung, daß bei im Normaltag angezüchteten Material außer den im Tagesabstand erscheinenden Gametenmaxima noch angesattelte oder zwischengeschobene Nebenmaxima erscheinen können. Dies ist vor allem bei ♀ - die eine besonders starke Tendenz zur Paarung im Dunkeln besitzen - der Fall (s. Abb. 23). Aber auch bei ♂ und ⊕ tritt dieser Effekt auf, sofern man die Lichtaktivierbarkeit mit mittleren Intensitäten von weißem Licht erfaßt (s. Abb. 21 a, b). Sogar bei Material, welches im DL angezüchtet wurde, können kleine Zwischengipfel erscheinen (s. Abb. 30). Weiterhin kann auch der durch eine Kälte- bzw. Wärmebehandlung erzielte Aufspaltungs- bzw. Schärfungseffekt (s. Abb. 21 a, b) in der Hypothese berücksichtigt werden. Nimmt man für den Oscillator eine nur in kleinem Bereich variable Periodenlänge und Amplitude an, andererseits jedoch durch Außenfaktoren zu beeinflussende Energieniveaus, zwischen denen der Oscillator schwingt (s. BÜNNING[21]), so werden die eben beschriebenen Effekte verständlich, wenn die sexuelle Aktivierung von zwei Reaktionen abhängt, die nur bei bestimmten Energielagen des Oscillators ablaufen können (s. BÜNNING[22]). An Hand des Schemas der Abb. 31 erklärt sich das wie folgt: Die ausgezogene Kurve stellt das Schwingen des Oscillators bei normaler Temperatur (20 °C) dar; der Oscillator pendelt zwischen einem oberen und unteren Energieniveau. Solange der Oscillator den Bereich E_V durchläuft, wird eine für die sexuelle Aktivierung norwendige Vorstufe V bereitgestellt. Diese wird zur Zeit der größten Entspannung, d. h. wenn der Oscillator den Bereich E_X durchläuft, zur Synthese der sexuellen Affinität aufgebraucht. Nach längerer Kältebehandlung schwingt der Oscillator zwischen zwei etwas niedrigeren Energieniveaus (gepunktete Kurve). Jetzt wird der Bereich E_X zweimal ganz durchlaufen, d. h. es tritt eine Verbreiterung bzw. sogar Aufspaltung des Gametenmaximums auf. Das Nebenmaximum ist notwendig kleiner, da inzwischen keine Nachbildung von V erfolgt ist. Nach einer längeren Wärmebehandlung schwingt der Oscillator zwischen höheren Energieniveaus (gestrichelte Kurve) und der E_X-Bereich wird nur angeschnitten, d. h. die Gametenmaxima erscheinen schärfer. Bei im

DL gezüchtetem Material kann sich der Oscillator in einer Ruhestellung z. B. E_0 befinden. Die Folge ist, daß der Gametentiter über den ganzen Tag hinweg gleichmäßig gering ist (Abb. 28 a). Wird der Oscillator angestoßen, so schwingt er anfangs um niedere Energielagen offenbar so, daß E_X zweimal überstrichen wird, d. h. er verhält sich wie nach Kältebehandlung (gepunktete Kurve). Die starke Paarungstendenz von im Normaltag angezogenen ♀ kann als Folge eines größeren E_V-Bereichs und eines etwas höher liegenden E_X-Bereiches erklärt werden. Unerklärt bleibt jetzt noch, weshalb bei Normaltagkulturen von ♂ und ♀ der durch mittlere Intensitäten weißen Lichtes induzierte Prozentsatz an Gameten - ähnlich dem Dunkelgametentiter von ♀ - tagesperiodisch Haupt- und Nebenmaxima zeigt. Während die starke Erhöhung des Gametentiters gegenüber den Dunkelkontrollen als eine direkte Aktivierung der Synthese der sexuellen Affinität durch weißes Licht angesehen werden darf (s. X), könnte man das Auftreten der Nebengipfel durch die unwahrscheinliche Annahme interpretieren, daß das Energieniveau des Oscillators durch weißes Licht heruntergesetzt wird. Dies würde dann ein Oscillieren um niedere Energieniveaus vortäuschen (gepunktete Kurve) und damit zu Auftreten von Nebenmaxima führen. Es gibt jedoch noch eine elegantere Möglichkeit, um das Auftreten von Nebenmaxima als Folge des Lichteinflusses zu erklären.

Versucht man eine Interpretation des Schemas der Abb. 31 an dem durch Gleichung (19) in X 3 gegebenen Fließgleichgewicht

$$Y\ldots \xrightarrow{k'} \ldots X\ldots \xrightarrow{k} \ldots A, \qquad (19)$$

so könnte man z. B. annehmen, daß in der Synthesekette, die zum Aufbau des Kontrollsubstrates X aus der Vorstufe Y führt, zwei Übergänge a und b liegen, bei denen die Durchflußgrößen tagesperiodisch antagonistisch schwanken und durch die die Synthese von V aus Y und X aus V kontrolliert wird:

$$Y\ldots \xrightarrow{a} \ldots V\ldots \xrightarrow{b} \ldots X\ldots \xrightarrow{k} \ldots A. \qquad (19')$$

Bei im Normaltag angezüchtetem Material operiert das System nach Überführung ins DD so, daß der Durchfluß an der Stelle a seinen Maximalwert zZt. des ursprünglichen Nachtbeginns erreicht;

zu dieser Zeit ist der Durchfluß bei b und damit auch die Konzentration von X minimal. Aus Y wird also abends ein "pool" von V angelegt. Der Durchfluß bei b erreicht seinen Maximalwert z. Zt. des ursprünglichen Tagbeginns; zu dieser Zeit ist der Durchfluß bei a am stärksten gedrosselt: Das Verhältnis des Kontrollsubstrates X zu der Vorstufe V ist also morgens am größten. Die Konzentration der Vorstufe V ist jedoch im D bereits in den ersten Vormittagsstunden so weit abgesunken, daß der geringe Durchfluß bei a den Durchsatz an der Stelle b begrenzt, d. h. die Konzentration des Kontrollsubstrates X und damit der Prozentsatz der paarungsfähigen Zellen geht zurück. Nimmt man nun an, daß weißes Licht nicht nur den Durchfluß von V nach X, sondern auch von Y nach V grundsätzlich erhöht, so kann das Auftreten von Zwischengipfeln unter Einfluß von weißem Licht erklärt werden, ohne daß eine Beeinflussung der Energielagen des Oscillators postuliert werden muß. Schematisch ist dies in Abb. 32 dargestellt. Wenn die Hypothese, daß das Licht an zwei verschiedenen Stellen in der Synthesekette von X angreift, richtig ist, dann wäre es prinzipiell möglich, daß die Wirkung des Lichtes jeweils durch Absorption in verschiedenen Pigmenten zustande kommt. Ein erster Hinweis hierfür ist die Mitteilung von FORSTER[37,38], wonach bei ♂ die Wirkungsstärken der sexuellen Aktivierung für blaues und grünes Licht, bezogen auf gelbes, starken Schwankungen unterliegen. Eine weitere Stütze ist der Versuch der Abb. 33, bei dem die Lichtaktivierbarkeit durch gelbes Licht (λ = 589 nm) über den Tagesverlauf geprüft ist. Ein Zwischengipfel in den Abendstunden tritt hier nicht auf. Das bedeutet aber, daß gelbes Licht die Bildung der Vorstufe V aus Y nicht oder nur geringfügig beschleunigt. Gelbes Licht wirkt demnach vorwiegend auf den Umbau von V zu X. Hiernach erscheint es sinnvoll, das Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung zu verschiedenen Tageszeiten aufzunehmen: Einmal zur Zeit des erwarteten Tagbeginns, zu einer Zeit also, während der eine hohe Konzentration von V in der Zelle zu erwarten ist und die Bildungsgeschwindigkeit von X aus V den Gametentiter bestimmt; zum anderen etwa 10...1 später, zu einer Zeit also, während der der Anstieg zum Zwischengipfel erfolgt und die Umbaugeschwindigkeit von Y zu V begrenzt für die sexuelle Aktivität wirkt.

XII. Das Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung und seine tagesperiodischen Schwankungen

1. Überlegungen zur Bestimmung der Wirkungsspektren

FÖRSTER[37,38] hat das Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung bestimmt, indem er probierte, welche Intensität I der variierten Wellenlänge λ in gleichen Zeiten gleich viel Gameten induziert, wie eine gegebene Intensität I_0 der Bezugswellenlänge λ_0 = 589 nm. Diese Methode ist nur anwendbar, wenn die Dosis-Effekt-Kurven bei den verschiedenen Wellenlängen ähnlich sind. Da nach der bisherigen Analyse aber damit zu rechnen ist, daß das Licht über Absorption in verschiedenen Pigmenten mit eventuell tagesperiodisch antagonistischen Schwankungen der Ausbeute einen Einfluß auf die sexuelle Aktivierung gewinnt, muß man mit uneinheitlichem Verlauf der Dosis-Effekt-Kurven rechnen. Damit würde aber die von FÖRSTER[37,38] verwendete Methode zur Bestimmung des Wirkungsspektrums von vornherein ausscheiden. Aufnahme von Dosis-Effekt-Kurven bei verschiedenen Wellenlängen ist somit Voraussetzung für eine einwandfreie Analyse des hier vorliegenden Systems.

Nimmt man an, daß die Quantenausbeute der photochemischen Prozesse, über die die sexuelle Aktivität der Zellen beeinflußt wird, in dem hier untersuchten Spektralbereich (400...800 nm) konstant ist, so erhält man nur dann Wirkungsspektren, die mit den Absorptionsspektren der wirksamen Pigmente identisch sind, wenn die mittlere Quantenstromdichte I am Funktionsort, d. h. am Ort der wirksamen Absorption, bei allen Wellenlängen gleich ist, und der beobachtete biologische Effekt entsprechend der zugrunde liegenden Reaktionskinetik (s. X) berücksichtigt wird. Weder die Photorezeptoren, über die die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas beeinflußt wird, noch deren Lokalisation in der Zelle sind vorerst bekannt. Man kann daher nicht angeben, in welchem Maße die Rezeptoren durch die Gesamtheit der Zellpigmente beschattet werden. Die stärkste Beschattung wäre zu erwarten, wenn die Photorezeptoren innerhalb des Chloroplasten - z. B. im Pyrenoid oder in den Mitochondrien - lokalisiert

wären. Doch auch bei Lokalisation an der Zelloberfläche wäre bei laufender Bewegung der Zellen im zeitlichen Durchschnitt mit einer vergleichbar starken Beschattung zu rechnen. Um abschätzen zu können, um wieviel Prozent ein in die Zelle eingestrahltes Lichtinkrement abgeschwächt wird, bis es an den Funktionsort gelangt, ist es notwendig, die Lichtschwächung auf dem Weg durch die Zelle zu messen. Nach IV 2 ist der Zelldurchmesser rund 10 μ. Eine einfache Zellschicht wäre also etwa 10 $\mu = 10^{-3}$ cm dick. Zu ihrer Herstellung müßten 10^{-3} cm^3 Zellen pro cm^2 verteilt werden. Mißt man daher in einer Suspension mit einer Flächenbelegung von 10^{-3} cm^3 Zellen pro cm^2 den Durchlaß bei senkrechtem Strahlungsdurchtritt, so erhält man ein ungefähres Bild von der Strahlungsabsorption in der einzelnen Zelle. An einer Θ-Suspension mit $w = 10^{-3}$ ergaben sich bei einer Flächenbelegung von 10^{-3} cm^3 Zellen/cm^2 in der ULBRICHT'schen Kugel gemessen (s. XII 3 f) für drei ausgezeichnete Wellenlängen (vergl. Abb. 49) die folgenden Durchlaßwerte d_λ: $d_{433} = 0{,}71$, $d_{546} = 0{,}96$, $d_{668} = 0{,}79$. Nach dem LAMBERT'schen Gesetz (s. XII 3 f)sind demnach für den Weg bis in Zellmitte Durchlaßwerte von $d'_\lambda = \sqrt{d_\lambda}$ zu erwarten: $d'_{433} = 0{,}84$, $d'_{546} = 0{,}98$, $d'_{668} = 0{,}89$. Das bedeutet, daß von der eingestrahlten Energie noch mindestens 84 % im blauen, 98 % im grünen und 89 % im roten Spektralbereich an den Ort der wirksamen Strahlungsabsorption gelangen. Da nach Abb. 17 die erfaßten Konzentrationsunterschiede des Kontrollsubstrates X dem Logarithmus der Dosis proportional sind, ist im ungünstigsten Fall mit einer Erniedrigung von c auf: log 84/log 100 = 96,2 % im blauen, log 98/log 100 = 99,6 % im grünen und log 89/log 100 = 97,5 % im roten Spektralbereich zu rechnen. Damit können die innerhalb der einzelnen Zelle auftretenden Intensitätsunterschiede in ihrer Auswirkung auf die Maßzahl c vernachlässigt werden. Den oben angegebenen Bedingungen zur Bestimmung der Wirkungsspektren wird man daher vorerst am besten gerecht, wenn man dafür sorgt, daß bei den verschiedenen Wellenlängen λ die gleiche mittlere Quantenstromdichte in der Suspension herrscht, d. h. daß die einzelnen Zellen im zeitlichen Durchschnitt den gleichen Lichtgenuß erhalten. Um aus den unter diesen Umständen faßten wellenlängenabhängigen Unterschieden in der Paarungsrate

Aussage über die Wirkungsstärke der verschiedenen Wellenlängen zu erhalten, sind die folgenden Überlegungen zu berücksichtigen: Die Dosis D bei der Wellenlänge λ eingestrahlt, bedingt in der Paarungsrate einen Unterschied $G_\lambda - G_d$. Dieser Unterschied entspricht einem Konzentrationsunterschied des Kontrollsubstrates X von $c_\lambda - c_d$ und kann nach Gleichung (12) angegeben werden als:

$$c_\lambda - c_d = a \cdot (\text{Probit } G_\lambda/G_p - \text{Probit } G_d/G_p) \qquad (26)$$

Da nach Abb. 17 mit hinreichender Genauigkeit $d\,c/d \log D = n =$ konstant und $\lim_{D \to 0} c_\lambda = c_d$, ergibt sich für

$$c_\lambda - c_d = n \cdot \log (D + 1) \qquad (27)$$

oder nach D aufgelöst:

$$D = 10^{(c_\lambda - c_d)/n} - 1. \qquad (28)$$

Mit der Gleichung (28) läßt sich nun angeben, das wievielfache (= m) der Dosis D bei der Bezugswellenlänge λ_o eingestrahlt werden müßte, um den gleichen Unterschied in der Paarungsrate (= $G_\lambda - G_d$) zu erzielen, wie er durch die Dosis D bei der Wellenlänge λ erzielt wird. Der Faktor m ist also identisch mit dem Verhältnis der Wirkungsstärken W der beiden Wellenlängen λ und λ_o. Man erhält demnach:

$$\frac{W_\lambda}{W_{\lambda_o}} = m = \frac{m \cdot D}{D} = \frac{10^{(c_\lambda - c_d)/n} - 1}{10^{(c_{\lambda_o} - c_d)/n} - 1} \qquad (29)$$

Definiert man die Wirkungsstärke der Bezugswellenlänge λ_o zu $W_{\lambda_o} = 1$ und setzt (26) in (29) ein, so ergibt sich schließlich:

$$W_\lambda = \frac{10^{\frac{a}{n} \cdot (\text{Probit } G_\lambda/G_p - \text{Probit } G_d/G_p)} - 1}{10^{\frac{a}{n} \cdot (\text{Probit } G_{\lambda_o}/G_p - \text{Probit } G_d/G_p)} - 1} \qquad (30)$$

In die Gleichung (30) gehen außer den bei gleicher mittlerer Quantenstromdichte bei verschiedenen Wellenlängen erhaltenen Paarungsratenunterschiede der Quotient a/n ein. Dieser ist aber, wie man aus Abb. 17 und Gleichung (26) ersieht, identisch mit

der Steigung der Dosis-Effekt-Kurve für λ_o: d (Probit G/G_p) / d log D = a/n. Die Gleichung (30) kann daher in all den Fällen zur Bestimmung von Wirkungsspektren herangezogen werden, in denen ein in Form von relativen Häufigkeiten angegebenes Merkmal (entspricht hier G/G_p) bezüglich des Logarithmus der Dosis normal verteilt ist und für eine Bezugswellenlänge λ_o die Steigung (entspricht hier a/n) der Dosis-Effekt-Kurve im logarithmischen Wahrscheinlichkeitsnetz bekannt ist. Die nach Einstrahlung gleicher Quantenströme bei den Wellenlängen λ und λ_o erhaltenen Unterschiede in der relativen Merkmalshäufigkeit ermöglichen dann die Berechnung der Wirkungsstärke W_λ. Voraussetzung ist jedoch, daß bis zu der verwendeten Dosis D bei der Wellenlänge λ die Dosis-Effekt-Kurve einheitlich ist, d. h. d c / d log D = konstant. Um auch negative Wirkungsstärken berechnen zu können, bedarf es nur der Einführung von Betragsstrichen in den Exponenten der Gleichung (30). Sie lautet dann:

$$W_\lambda = \frac{10^{\frac{a}{n}\left|\text{Probit } G_\lambda/G_p - \text{Probit } G_d/G_p\right|} - 1}{10^{\frac{a}{n}\left|\text{Probit } G_{\lambda_o}/G_p - \text{Probit } G_d/G_p\right|} - 1}. \qquad (30')$$

2. Vorversuche zum Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung

a) Methodik

In Vorversuchen wurden mit der von FÖRSTER[37,38] verwendeten Anordnung bei einigen Wellenlängen Dosis-Effekt-Kurven aufgenommen. Jeweils 5 cm^3 Zellsuspension mit $(2{,}5\ldots3)\cdot10^{-3}$ cm^3 Zellen wurden 5 min lang in einer Küvette mit planparallelem Boden von 4 · 5 cm in der unter XII 3 beschriebenen Anlage belichtet. Dabei wurde wie bei FÖRSTER[37,38] horizontal geschüttelt mit einem Hub von a = 0,5 cm und einer Frequenz von ν = 1 sec^{-1}. Die Strahlungsmessung erfolgte wie in XII 3 d angegeben. Unmittelbar nach der Belichtung wurden die Proben mit 2 cm^3 Suspension mit $(6\ldots8)\cdot10^{-3}$ cm^3 voll aktiven Testzellen gemischt. Nach 2 h wurde fixiert und nach dem Paarungstest (III 5) ausgewertet. Die Versuchstemperatur war durchweg 20 ± 0 °C. Die von FÖRSTER[37,38] angewendete Methode, die Paarung mit

Testpartner bei 14 °C ablaufen zu lassen, muß als fehlerhaft verworfen werden. Es ist zwar richtig, daß große fördernde Wirkungen wegen der positiven Temperaturabhängigkeit der Rückreaktion bei tieferen Temperaturen größer erscheinen, andererseits werden aber wegen des Ansteigens des Dunkelgametentiters mit fallender Temperatur, kleine Wirkungen geschluckt (vergl. hierzu X 3).

b) Ergebnisse

Die Ergebnisse von Versuchen, bei denen die Wirkung der Wellenlängen 589, 705 und 744 nm z. Zt. des ersten Dunkelgametenmaximums, d. h. z. Zt. des ersten erwarteten Lichtbeginns untersucht wurden, sind in Abb. 34 dargestellt. Bei 589 nm ist bereits die Probe, die eine durchschnittliche Dosis $D = N \cdot t = 0{,}311\ mm^3$ Quanten/min · 5 min = $1{,}55\ mm^3$ Quanten erhalten hat, gegenüber dem Dunkelgametentiter signifikant ($P > 99{,}73\ \%$) verbessert. An dem fördernden Einfluß von gelbem Licht (589 nm) kann demnach kein Zweifel bestehen. Dagegen wird für rotes Licht der Wellenlänge 705 nm bis herauf zu einer Dosis von $D = 139\ mm^3$ Quanten die Warngrenze ($P > 95\ \%$) nicht erreicht; eine Wirkung auf die sexuelle Aktivität ist also z. Zt. des 1. Dunkelgametenmaximums nicht vorhanden oder äußerst gering. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit FÖRSTER[37,38] und in Widerspruch zu LEWIN[87]. Die Schwankungen des Dunkelgametentiters sind ebenfalls gut gesichert. Der erste Wert in Abb. 34 a (17^{11}) ist z. B. signifikant ($P > 99{,}73\ \%$) verschieden vom zweiten (17^{25}); dieser wie auch der dritte Wert (17^{31}) sind gegenüber dem vierten (18^{03}) gleichermaßen signifikant verschieden. Auch in Abb. 34 b ist der Anstieg des Dunkelgametentiters gut gesichert. Bei diesem Versuch mit dunkelroter Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 744$ nm besteht bis herauf zu einer Dosis von $2{,}08\ mm^3$ Quanten ein signifikanter ($P > 99{,}73\ \%$) hemmender Einfluß, der mit weiter ansteigender Dosis wieder verschwindet. Wie im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt werden wird, ist das Verschwinden der Hemmung hier jedoch keine Funktion der wachsenden Dosis, sondern eine Funktion der Tageszeit, bei der der Versuch durchgeführt wird.

Aus Versuchen der vorstehenden Art ist es nicht möglich, die Wirkungsstärken W_λ mittels der Formel (30') zu berechnen, da sowohl der Dunkelgametentiter wie auch die Lichtinduzierbarkeit als Funktionen der Zeit bei den verschiedenen Bestimmungen verschieden sind, d. h. $d\,G_d / d\,t \neq 0$, bzw. für eine konstante Dosis $d\,G_\lambda / d\,t \neq 0$. Mit der nach (30') verallgemeinerten Formel:

$$W_\lambda = \frac{10^{|\text{Probit } G_\lambda/G_p - \text{Probit } G_{d\lambda}/G_p|} - 1}{10^{|\text{Probit } G_{\lambda o}/G_p - \text{Probit } G_{d\lambda o}/G_p|} - 1} \qquad (31)$$

lassen sich zwar die Schwankungen des Dunkelgametentiters adäquat eliminieren, nicht aber die Änderungen der Lichtinduzierbarkeit. Es ist möglich, an Stichproben der gleichen Zellsuspension den Einfluß einer Dosis D von $N \cdot t$ Quanten nacheinander bei den verschiedenen Wellenlängen λ zu bestimmen. In Abb. 35 sind 4 von insgesamt 10 (8 an ♀, 2 an ♂) gleichsinnigen Experimenten dieser Art dargestellt. Die Proben erhielten bei allen Wellenlängen bei konstantem Quantenstrom $N = 1{,}04$ mm^3 Quanten/min eine Dosis D von 5,2 mm^3 Quanten. Die Experimente von Abb. 35 a, b, und c sind an ♀ durchgeführt und zwar nach dem ersten, bzw. z. Zt. des zweiten Dunkelgametenmaximums und z. Zt. des zweiten Dunkelgametenminimums. Das Experiment der Abb. 35 d ist an ♂ z. Zt. des ersten Maximums durchgeführt. In Versuch 35 a sind die G_λ/G_p-Werte von λ = 400...627 nm von den zugehörigen G_d/G_p-Werten signifikant ($P > 99{,}73$ %) verschieden, d. h. diese Wellenlängen haben fördernde Wirkung. Der Wert für 705 nm weist auf eine hemmende Wirkung, die Differenz gegen G_d/G_p ist aber nur im Warnbereich ($P > 95$ %). Wirkungsunterschiede zwischen den folgenden Wellenlängen können mit $P > 99{,}73$ % gesichert werden: 400/461; 400/467; 508/461, /467, /583...608; 627/606...546, /467...433. In den Warnbereich ($P > 95$ %) fallen die Differenzen zwischen: 400/589; 400/627; 546/508 und 461/433. Im Versuch der Abb. 35 b bei dem keine Dunkelgameten auftraten, besteht eine fördernde Wirkung nur noch für die Wellenlängen 467, 589 und 608 nm mit einer schwachen Sicherung von $P > 95$ %. Im Versuch der Abb. 35 bestehen wieder gut zu sichernde Unterschiede ähnlich wie bei

Abb. 35 a, jedoch besteht kein Hinweis für den hemmenden Einfluß von Dunkelrot. Im Versuch der Abb. 35 d, der an ♂ durchgeführt ist, besteht für den hemmenden Einfluß von 681 nm eine Sicherheit von $P \approx 99$ %. Für 467 nm dagegen ist ein fördernder Einfluß nur mit $P \approx 98$ % gesichert, für 608 nm nur noch mit $P \approx 87$ %. Vernachlässigt man die Schwankungen in der Lichtempfindlichkeit, die während der Versuchsdauer von < 120 min aufgetreten sind, so kann man mittels der Formel (31) provisorische Wirkungsspektren (Abb. 36) erhalten. Es sei hierzu bemerkt, daß für die Versuche in Abb. 35 a bzw. c sich nach Gleichung (26) für $c_{589} - c_d$ Werte von 1,86 a bzw. 1,89 a ergeben. Das bedeutet, daß die Lichtempfindlichkeit in beiden Fällen etwa gleich war. Die Methode kann wegen unbefriedigender Genauigkeit jedoch nur als orientierende Schnellmethode gewertet werden. Dies liegt vor allem daran, daß bei Anwendung der Gleichung (31) in die Bestimmung der Wirkungsstärken W_λ auch die Fehler der Dunkelgametentiter $G_{d\lambda}/G_p$ und $G_{d\lambda o}/G_p$ eingehen. Trotzdem bestätigen die Wirkungsspektren der Abb. 36 weitgehend die von FÖRSTER[37,38] für ♂, ♀ und ⊖ angegebenen. Sie liefern darüber hinaus bereits Hinweise für die Existenz von tagesperiodischen Schwankungen im Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung. Um diese Effekte zu sichern, mußte die Genauigkeit der Methode gesteigert werden. Dies wurde einmal dadurch erreicht, daß nur Messungen verglichen wurden, die zur gleichen Zellzeit (s. III 9) durchgeführt worden sind. Zum anderen wurde berücksichtigt, daß die Reaktionsfähigkeit des Materials von Kulturschale zu Kulturschale etwas schwankt. Zur Berechnung von Wirkungsstärken wurden daher nur Messungen herangezogen, die an Stichproben des gleichen Materials durchgeführt worden sind. Es mußte also eine Anlage verwendet werden, bei der mehrere monochromatische Strahlengänge mit variierbarer Intensität und Wellenlänge zur Verfügung standen. Wegen der starken Temperaturabhängigkeit der Paarungsrate erschien es günstig, die Versuche weiterhin im Wasserbad durchzuführen. Um eine weitere große Fehlerquelle, das Umfüllen der aktivierten Zellsuspensionen, zu eliminieren, wurde in manometrischer Anordnung mit Anhanggefäßen gearbeitet. Gleichzeitig ermöglichte dies eine Prüfung eventuell vorhandener atmosphärischer Einflüsse. Die nachfolgend beschriebene Anlage erfüllt alle hier aufgeführten Anforderungen.

3. Die Interferenzfilter-Monochromatoranlage für Versuche in manometrischer Anordnung

a) Die Strahlungsquelle

Da vorerst nur der Einfluß sichtbarer Strahlung (400...800 nm) auf die sexuelle Aktivität der Chlamydomonaszelle untersucht werden sollte, genügten Wolframfadenlampen als Strahlungsquellen. Von der Fa. OSRAM hergestellte Schmalfilmkinolampen vom Typ 58.8880 E, 125 V, 500 W; 58.8980 E, 125 V, 750 W; 58.8985 E, 125 V, 1000 W wurden den Intensitätsanforderungen gerecht. Bei diesen Lampen sind die Leuchtwendel auf einer quadratischen Fläche von 1,5 · 1,5 cm parallel ausgespannt, um eine möglichst homogene Strahlungsfläche zu erhalten. Diese emitiert, dem Charakter der Metallfadenlampe entsprechend, ein kontinuierliches Spektrum, dessen relative Energieverteilung von 800 bis 400 nm auf etwa 1/10 abfällt. Die Stromversorgung der Lampen erfolgte über einen Ringkernregeltransformator der Fa. PHYWE, dem im Bereich von 0...250 Volt Stromstärken bis zu 12 A entnommen werden können. Die dem Transformator zugeführte Wechselspannung wurde einem maschinengeregelten Netzstabilisator der Fa. GRIESENHAGEN entnommen, der bei einer Leistung von 2 kVA Netzschwankungen zwischen 154 und 242 Volt auf 220 Volt ± 1 % ausregelt. Bei einem Leistungsbedarf bis 500 VA wurde noch zusätzlich ein magnetischer Spannungsgleichhalter der Fa. STEINLEIN (220 V~, 500 VA) zwischengeschaltet.

Die Lebensdauer der Lampen beträgt bei Vollast etwa 25 h, kann jedoch bei Betrieb an Unterspannung beträchtlich erhöht werden. Von diesem Vorteil wurde,soweit möglich, Gebrauch gemacht. Die Lampenbrennspannung konnte durch ein dem Wendel parallel liegendes Voltmeter laufend kontrolliert werden.

b) Die optische Anordnung

Die Anordnung der einzelnen Bauelemente der Anlage ist aus Abb. ersichtlich. Die Lampe ist von einem lichtdichten Stahlblech-

gehäuse umgeben, dessen Boden doppelt ist. Der Bodenzwischenraum ist durch eine Trennwand geteilt. Aus der so entstandenen vorderen Kammer wird der Lampe mit einem regulierbaren Gebläse Kühlluft zugeführt. Der Luftabzug erfolgt durch die hintere Kammer. Damit kein Streulicht in den Raum dringt, ist die Luftabführung mehrfach gewinkelt. Innerhalb des Lampengehäuses befinden sich noch die Kondensorblende und die Kondensorlinse. Auf einen Hilfsspiegel wurde zugunsten höherer Lampenlebensdauer verzichtet. Im Brennpunkt der Kondensorlinse steht die Leuchtwendel, d. h. sie wird ins Unendliche abgebildet. Man erhält auf diese Weise ein nahezu paralleles Strahlenbündel. Dieses verläßt das Lampengehäuse durch eine mit Irisverschluß versehene Öffnung. Es folgen im Strahlengang zwei gebläsegekühlte Küvetten mit je 5 cm Wasserschicht (= H_2O) zur Absorption der Wärmestrahlen, eine Kreisblende (4 cm ø) und ein Filterhalter. Dieser wird verwendet, wenn in den 3 Strahlengängen der gleiche Spektralbereich zur Anwendung kommen soll. Die Aufteilung in drei Strahlengänge erfolgt durch unter 45° gestellte teildurchlässige Spiegel oder Glasplatten in Position 1 und 2, sowie einen gewöhnlichen Silberspiegel in Position 3. Ist eine energetisch gleichmäßige Aufteilung erwünscht, so kommt in Position 1 ein teildurchlässiger Spiegel, der etwa 70 % ausbricht, in Position 2 einer, der etwa 50 % ausbricht. Auf diese Weise entfällt auf jeden Strahlengang etwa 1/3 der ursprünglichen Intensität. Bringt man in Position 1 und 2 je eine planparallele Glasplatte, so erhält man eine bezüglich der Intensität stark gestufte Aufteilung. Nach den FRESNEL'schen Formeln (s. z. B. MIERDEL[93]) wird nämlich bei einem Einfallswinkel von 45° an einer in Luft stehenden Glasplatte ($n \approx 1{,}5$) etwa 10 % der eingestrahlten Intensität reflektiert. Man erzielt also für die Strahlengänge 1, 2, 3 eine Intensitätsstufung wie 100 : 1 : 10. Je Strahlengang ist nach den Aufteilungsspiegeln ein Filterhalter montiert. Diese Filterhalter ermöglichen das Ausfiltern verschiedener Spektralbereiche in den 3 Strahlengängen. Hinter den Filterhaltern stehen Kreisblenden (4 cm ø), die durch die Objektivlinsen ($f \approx 20$ cm) als Kreise von 2 cm ø abgebildet werden. Unmittelbar nach den Objektivlinsen fällt die Strahlung in einen

Wasserthermostaten (H_2O), dessen Temperatur durch Wasserkühlung und relaisgesteuerte Heizung im Bereich 15...35 °C auf ± 0,1 °C konstant gehalten werden kann. Die Wände des Thermostaten bestehen aus planparallelen Glasplatten, und sind bis auf die Eintrittsöffnungen für die Strahlenbündel mit schwarzem Photokarton abgedeckt. Durch einen im Wasser mit 45° Neigung montierten Spiegel werden die horizontal laufenden Strahlenbündel senkrecht nach oben reflektiert. Die Blendenbilder fallen auf diese Weise etwa 5 cm unter die Wasseroberfläche in die Bodenflächen von Manometriegefäßen. Zur Justierung muß das Aquarium mit Wasser gefüllt sein, da die Bildweite in Wasser wegen der hohen Brechkraft größer ist als in Luft. Eine unabhängige kontinuierliche Intensitätsregelung in allen drei Strahlengängen erzielt man durch Einbau von Irisblenden nahe den Objektivlinsen. Alle optischen Bauelemente der Apparatur sind, sofern sie sich außerhalb des Aquariums befinden, auf optischen Bänken montiert und justierbar. Die Strahlengänge sind mit schwarzem Photokarton so abgeschirmt, daß kein Streulicht in den Raum gelangt. In den Thermostaten können jeweils zwischen zwei Manometriegefäßen Bleche eingesetzt werden, um eine gegenseitige Beeinflussung durch Streulicht zu vermeiden.

c) Die Filterkombinationen

Für die Bestimmung eines Wirkungsspektrums ist die Anwendung schmaler Spektralbänder Voraussetzung. Diese wurden aus der Strahlung der Kinolampen isoliert. Bei Verwendung einfacher Interferenzlinienfilter (IL) des Glaswerkes SCHOTT und Gen.*, wie sie für die Arbeit hauptsächlich zur Verfügung standen, ist die erzielte spektrale Reinheit oft nicht ausreichend. Aus diesem Grund wurden, sofern es energetisch möglich war, zwei Interferenzlinienfilter kombiniert. Dadurch wird die Halbwertsbreite zur Viertelwertsbreite. Durch vorgesetzte Farb

---

* MOHR et al.[102] haben diese Filter ausführlich beschrieben.

gläser, ebenfalls vom Glaswerk SCHOTT und Gen., wurde zusätzlich der Filteruntergrund reduziert. Die Abmessungen der Filter waren 2" ≡ 5,1 cm im Quadrat. Die charakteristischen Daten der verwendeten Filterkombinationen (= FK) sind in Tab.5 angegeben. Die Kombinationen wurden in die Filterhalter eingesetzt und mit einem Taschenspektroskop der Fa. SCHMIDT-HAENSCH auf Monochromasie geprüft. Da die Filter in der Apparatur praktisch nur von senkrecht auffallender Strahlung durchdrungen wurden, war die erzielte Monochromasie befriedigend.

d) Die Strahlungsmessung

Beleuchtungsstärken E in Lux wurden mit einem GOSSEN-Luxmeter vom Typ 5.55-756 (Photozelle: 9 cm ø, 80 Ω Innenwiderstand; Meßbereiche:6, 30, 300, x 10 Lux) gemessen. Im übrigen erfolgte die Strahlungsmessung mit einem LUMNER-KURLBAUM Großflächen-Bolometer der Fa. RÖHRIG (vergl. hierzu WARBURG[147] und die dort zitierte Literatur). Die Strahlungsmessung mittels Bolometer basiert auf der Strahlungsabsorption durch dünne geschwärzte Platinstreifen. Diese werden durch Absorption erwärmt und dadurch ändert sich ihr elektrischer Widerstand. Das verwendete Bolometer besteht aus vier Rahmenpaaren mit je 10 Platinstreifen,von denen zwei der Strahlung ausgesetzt werden können. Sie sind in Vervollkommnung der von WARBURG et al.[140] angegebenen Schaltung als Zweige einer WHEATSTONEschen Brücke geschaltet (Abb. 38), wobei die als Folge einer Bestrahlung in der Brücke austretenden Potentialdifferenzen mittels eines zweiten Stromkreises kompensiert werden. Das Galvanometer dient also nur als Nullinstrument. Die Eichung des Bolometers erfolgte mit einem Standard C-703 (Kohlenfadenlampe) der Radiometry Section, Bureau of Standards, Washington, wobei genau nach der angegebenen Anweisung verfahren wurde. Das Bolometerfenster war sowohl bei der Eichung wie auch bei den Versuchsmessungen mit einem Quarzfenster verschlossen. Hierbei tritt nur ein Reflexionsverlust auf, der vom UV bis zum IR gleichmäßig etwa 8,5 % beträgt und daher nicht berücksichtigt wird. Die Nutzfläche des Bolometers wurde analog der von WARBURG et al.[141] verwendeten Methode mit einer Serie quadratischer Blenden ermittelt.

Die erhaltenen Werte sind in Tab. 6 eingetragen. Die vorletzte Spalte enthält den auf einen Quadratzentimeter reduzierten Kehrwert des Kompensationswiderstandes. Dieser ist der absorbierten Energie und damit der eingestrahlten Intensität proportional. Man erkennt, daß bei einer Blendenfläche von 6 cm^2 die nutzbare Bolometerfläche überschritten ist. Bereits bei 6 cm^2 tritt ein Strahlungsverlust von 2,5 % auf, der auf innere Wärmeleitung zurückzuführen ist. Entsprechend diesem Ergebnis wurde zur Strahlungsmessung nur der zentrale Bolometerbereich bis zu 4 cm^2 Fläche verwendet. Bei der Eichung fiel auf die 4 cm^2 des Bolometers eine Strahlungsleistung von $4 \cdot 43{,}9 \cdot 10^{-6} = 175{,}5 \cdot 10^{-6}$ Watt. Hierbei betrugen bei einer Raumtemperatur von 20 °C die Stromstärke in der Brücke i_B = 60,0 mA und die Spannung des Kompensationsakkumulators V_K = 2,03 V. Um das Galvanometer auf die Nullstellung zurückzubringen, mußte in den Kompensationskreis ein Widerstand von 9000 $\pm$ 50 Ω eingeschaltet werden. Der Anschlußfehler beträgt also $\approx \pm$ 0,5 %. Die Strahlungsleistung N, bei der ω Ohm zur Kompensation des Galvanometerausschlages erforderlich sind, errechnet sich dann bei der Temperatur t, einem konstanten Brückenstrom von i_B = 60 mA und der Spannung des Kompensationsakkumulators V_K nach WARBURG et al.[141] zu

$$N = \frac{9000 \cdot 175{,}5 \cdot 10^{-6}}{\omega\,(1 + 0{,}01\,\frac{20 - t}{3})} \cdot \frac{V_K}{2{,}03} \text{ Watt} \qquad (32)$$

oder

$$N = \frac{9000 \cdot 1755}{\omega\,(1 + 0{,}01\,\frac{20 - t}{3})} \cdot \frac{V_K}{2{,}03} \text{ erg/sec.} \qquad (32')$$

Für Messungen bei 20 °C vereinfacht sich der Ausdruck zu:

$$N = 7{,}79 \cdot 10^6 \frac{V_K}{\omega} \text{ erg/sec.} \qquad (33)$$

Da der Energiebetrag eines photochemischen Äquivalents = 1 Mol Quanten = 1 EINSTEIN als

$$E = L \cdot h \cdot \nu = L \cdot h \cdot \frac{c}{\lambda} = \frac{1{,}197 \cdot 10^8}{\lambda} \text{ erg/mol} \qquad (34)$$

angegeben werden kann - wobei die LOSCHMIDT'sche Zahl L = $6{,}02 \cdot 10^{23}$, das PLANCK'sche Wirkungsquant h = $6{,}626 \cdot 10^{-27}$ erg·sec, die Lichtgeschwindigkeit c = $2{,}998 \cdot 10^{10}$ cm/sec, die Frequenz ν der Strahlung ausgedrückt in sec^{-1} und die Wellenlänge λ in cm - erhält man die pro Zeiteinheit eingestrahlten mol Quanten als:

$$N = \frac{7{,}79 \cdot 10^{6}}{1{,}197 \cdot 10^{8}} \cdot \frac{\lambda \cdot V_K}{\omega} \text{ mol Quanten/sec} \qquad (35)$$

oder

$$N = 3{,}9 \frac{\lambda \cdot V_K}{\omega} \text{ mol Quanten/min} \qquad (35')$$

Da 1 mol = 22,4 l = $2{,}24 \cdot 10^{7}$ mm^3, läßt sich N auch ausdrücken als:

$$N = 8{,}74 \cdot 10^{7} \cdot \frac{\lambda \cdot V_K}{\omega} \; mm^3 \text{ Quanten/min} \qquad (36)$$

Wegen der wechselnden Reinheit des Thermostaten-Wassers und seiner Scheiben und Spiegel wurde in Anlehnung an WARBURG et al.[151] die Intensität des Versuchslichtes nach Austritt des Lichtstrahls aus dem Thermostaten gemessen. Hierzu wurden die Versuchsgefäße aus dem Thermostaten entfernt und das den Thermostaten in vertikaler Richtung verlassende Strahlenbündel mit einer Linse und einem 45° Spiegel auf die "nutzbare" Bolometerfläche konzentriert (s. Abb. 37). Es wird hierbei, da die Einfallsebenen für den Thermostatenspiegel und den Umlenkspiegel identisch sind, gleichzeitig ein Meßfehler vermieden, der aus der Tatsache resultiert, daß unter 45° reflektiertes Licht partiell linear polarisiert wird (s. z. B. MIERDEL[93]). Dieser Umstand war z. B. bei der von FÖRSTER[37,38] verwendeten Apparatur nicht berücksichtigt. Die Korrektur, die bei der hier beschriebenen Anordnung bei der Strahlungsmessung anzubringen ist, beschränkt sich daher auf die Unterschiede in den Reflexions- und Absorptionsverlusten, die auf dem Weg zum Bolometer einerseits und auf dem Weg in die Zellsuspension andererseits, auftreten. Bei der Strahlungsmessung tritt durch Reflexion an der Grenze Wasser:Luft ein Strahlungsverlust auf. Dadurch wird die Intensität auf den Bruchteil d_m

erniedrigt. Andererseits tauchen die Versuchsgefäße in das Wasser ein und es tritt zweimal ein Strahlungsverlust durch Reflexion auf, nämlich an den Grenzen Wasser:Glas und Glas: Wasser. Deshalb gelangt nur ein Bruchteil der Strahlung = d_v in die Zellsuspension. Bei Anwendung der FRESNEL'schen Formel für senkrechte Inzidenz:

$$d = 1 - \left(\frac{n - 1}{n + 1}\right)^2 \qquad (37)$$

wobei die Brechungsverhältnisse n für die Übergänge Wasser: Luft = 0,75; Wasser:Glas = 1,13; Glas:Wasser = 0,89 im Bereich 400...800 nm als konstant angenommen sind, berechnet sich für d_m = 0,976 und für d_v = 0,9964 · 0,9966 = 0,993. Zusätzlich ist noch die Durchlässigkeit D des Spiegels und der Linse, durch die die Strahlung auf das Bolometer konzentriert wird, als Meßkorrektur zu berücksichtigen. Die Durchlässigkeit D ist von der Wellenlänge λ abhängig und für die verschiedenen Filterkombinationen experimentell bestimmt worden. In Tab. 7 sind die Werte angegeben. Man erhalt somit für den in die Zellsuspension eingestrahlten Lichtstrom N_v:

$$N_v = \frac{d_v \cdot N}{d_m \cdot D_\lambda} = 1{,}02 \frac{N}{D_\lambda} \qquad (38)$$

und nach Einsetzen von (33) bzw. (36) schließlich:

$$N_v = 7{,}95 \cdot 10^6 \cdot \frac{V_K}{D_\lambda \cdot \omega} \text{ erg/sec} \qquad (39)$$

bzw.:

$$N_v = 8{,}92 \cdot 10^7 \frac{\lambda \cdot V_K}{D \cdot \omega} \text{ mm}^3 \text{ Quanten/min.} \qquad (40)$$

Die bolometrische Messung war bis zu ω = 10000 Ω - dies entspricht nach (40) bei λ_o = 589 nm und V_K = 2,00 V einem Lichtstrom N_v von 1,24 mm^3 Quanten/min - auf etwa 1 % genau, jedoch bis zu $\omega \approx 150000\,\Omega$ - entsprechend 0,083 mm^3 Quanten/min - bei einem Fehler von 5 % möglich. Ein Kompensationswiderstand von 150000 Ω entspricht nach (39) einer Strahlungsleistung von 125 erg/sec. Da die nutzbare Bolometerfläche 4 cm^2 beträgt, kann man mit der hier verwendeten bolometrischen Anordnung Intensitäten bis herunter zu I = 30 erg/ cm^2. sec messen. Ver-

gleichsweise erhalten MOHR et al.[102] bei ihrem Thermosäulen-Galvanometersystem pro 141 erg/cm^2 · sec einen Ausschlag von einem Skalenteil.

Zur Messung von Lichtströmen bis zu 2 mm^3 Quanten/min erwies sich zusätzlich ein Selen-Photoelement (Typ 5.55-756 der Fa. GOSSEN) in Kombination mit einem Multiflex-Galvanometer (Typ MGF 1 der Fa. Dr. B. LANGE, Eingangswiderstand 60 Ω, Empfindlichkeit 2 · 10^{-8} A/mm) als günstig. Die Eichung dieses Systems erfolgte, indem in einem mit dem Bolometer eingemessenen Strahlengang die Photozelle parallel zur Wasseroberfläche des Thermostaten eingefügt wurde und die sich ergebenden Multiflex-Galvanometer-Skalenteile nach 2 min abgelesen wurden. Die Galvanometerausschläge waren bis zu Quantenstromen von 2 mm^3 Quanten/min dem eingestrahlten Lichtstrom direkt proportional. In Tab. 7 ist angegeben, wieviel Multiflex-Galvanometer-Skalenteile (= MGSkt) bei den verschiedenen Filterkombinationen einem Quantenstrom von N_v = 1,00 mm^3 Quanten/min entsprechen. Diese Galvanometerausschläge, in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen, entsprechen erwartungsgemäß der spektralen Empfindlichkeitskurve der Photozelle.

Im Laufe der Untersuchungen war es teilweise notwendig, Quantenströme bis herunter zu 0,0001 mm^3 Quanten/min einzumessen. Diese niederen Quantenströme erhält man, indem noch meßbare Quantenströme durch Einfügen von Neutralgläsern (SCHOTT und Gen.) bekannter Durchlässigkeit in den Strahlengang auf den gewünschten Wert reduziert werden.

e) Die Leistungsfähigkeit der Anlage

Die bei den Versuchen nutzbaren Strahlungsflächen sind die Blendenbilder von 2 cm Durchmesser, d. h. Flächen von π cm^2. Die in diesen Flächen mit den zur Verfügung stehenden Filterkombinationen bei einer Intensitätsstufung von 100:1:10 maximal erzielbaren Intensitäten fallen entsprechend der spektralen Energieverteilung der Wolframfadenlampen von Rot zu Blau stark

ab. In Tab. 8 sind für einige Filterkombinationen die erhaltenen Bestleistungen angegeben. Sie sind den Leistungen der von MOHR et al.[102] beschriebenen Pradoanlage gleichwertig.

f) Die Absorptionsmessung mit der ULBRICHT'schen Kugel

Zur Berechnung der mittleren Intensität $\bar{I}$ in einer Zellsuspension muß der Durchlaß d_λ bzw. die Absorption $\alpha_\lambda = 1 - d_\lambda$ der Zellsuspension bekannt sein. Diese Größen wurden in der ULBRICHT'schen Kugel ermittelt.* Dabei wurde im wesentlichen nach der von WARBURG et al.[148] angegebenen Methode verfahren. Die ULBRICHT'sche Kugel ist von der Fa. SCHMIDT-HAENSCH geliefert und hat einen Durchmesser von 50 cm. Als Strahlungsdetektor dient ein Photoelement (Typ S 60, 200 Ω Innenwiderstand) der Fa. Dr. B. LANGE, das mit einem Multiflexgalvanometer (Typ MGF 1, w. u. XII 3 d) von der gleichen Firma gekoppelt war. Der Strahlengang 1 der Anlage (s. Abb. 37) wurde mit einem unter 45° gestellten Spiegel senkrecht nach oben in die Kugel umgelenkt und mit einer Linse so gesammelt, daß im Zentrum der Kugel ein Kreis von 2 cm Durchmesser homogen ausgebuchtet ist. An diese Stelle kamen abwechselnd das Versuchsgefäß mit der Suspension lebender Zellen und ein Gefäß, das in gleicher Konzentration "weiße" Chlamydomonaszellen - das sind Zellen, aus denen alle Pigmente mit Methanol extrahiert sind - enthält. Die Gefäße wurden bei der Absorptionsmessung

*Bei Absorptionsmessungen an Zellsuspensionen in der ULBRICHT'schen Kugel wird alles durch die Zellen gestreute Licht gesammelt. Bei der Opal-Glas-Methode dagegen - von SHIBATA et al. (zitiert nach LATIMER[77]) angegeben - geht der von den Zellen nach hinten gestreute Strahlungsanteil verloren. Deshalb findet man, mit der Opal-Glas-Methode höhere Absorptionen als mit der ULBRICHT'schen Kugel, eine Tatsache, auf die bereits WARBURG[147] und LATIMER[77] hingewiesen haben. Zur Absorptionsmessung wurde daher der ULBRICHT'schen Kugel der Vorzug gegeben.

nicht bewegt, jedoch wurden unmittelbar vor der Messung die Zellen gleichmäßig suspendiert. Bei Vernachlässigung der Sekundärabsorption ergibt sich die Durchlässigkeit d_λ einer Zellsuspension als der Quotient der Galvanometerausschläge bei der "grünen" (a_g) und bei der "weißen" (a_w) Suspension:

$$d_\lambda = \frac{a_g}{a_w} \tag{41}$$

g) Die Berechnung der mittleren Intensität in der Zellsuspension

Die monochromatische Strahlung der Wellenlänge λ habe beim Eintritt in die Suspension die Intensität I_v. Ist die optische Weglänge des Strahles in der Suspension = x, so gilt für die austretende Intensität I das LAMBERT'sche Gesetz:

$$I = I_v \cdot e^{-kx}. \tag{42}$$

Durch die Streuung an den Zellen wird das eintretende Strahlenbündel in eine Unzahl von Teilstrahlen I_{vi} zerlegt, für die die optischen Weglängen x_i in der Suspension verschieden sind. Für die austretende Intensität I ist daher streng genommen zu schreiben:

$$I = \sum_{i=1}^{n} I_{vi} \cdot e^{-kx_i}. \tag{43}$$

Da aber für $n \to \infty$: $\sum_{i=1}^{n} I_{vi} = I_v$,

kann man I auch formell ausdrücken als:

$$I = I_v \cdot e^{-k\bar{x}}, \tag{42'}$$

wobei $\bar{x}$ die für I_v anzunehmende durchschnittliche mittlere Weglänge ist. Die mittlere Intensität $\bar{I}$ in der Suspension ergibt sich dann aus:

$$\bar{I} \cdot \bar{x} = \int_0^{\bar{x}} I_v \cdot e^{-k\bar{x}} d\bar{x}. \tag{44}$$

Durch Integration erhält man hieraus:

$$\bar{I} = \frac{I_v}{k\bar{x}} (1 - e^{-k\bar{x}}). \tag{45}$$

Mit $I/I_v = d_\lambda = e^{-k\bar{x}}$ bzw. $\log d_\lambda = -k\bar{x}$ kann dann die mittlere Intensität $\bar{I}$ in der Suspension angegeben werden als

$$\bar{I} = I_v \frac{d_\lambda - 1}{\log d_\lambda} . \qquad (46)$$

Multipliziert man die Gleichung (46) mit t durch, so erhält man die entsprechende Aussage für den mittleren Quantenstrom $\bar{N}$:

$$\bar{N} = N_v \frac{d_\lambda - 1}{\log d_\lambda} \qquad (47)$$

Durch Einsetzen von (40) in (47) erhält man schließlich:

$$\bar{N} = 8{,}92 \cdot 10^7 \frac{\lambda \cdot V_K \cdot (d_\lambda - 1)}{D_\lambda \cdot \omega \cdot \log d_\lambda} \text{ mm}^3 \text{ Quanten/min} \qquad (48)$$

oder nach ω aufgelöst:

$$\omega_\lambda = 8{,}92 \cdot 10^7 \frac{\lambda \cdot V_K \cdot (d_\lambda - 1)}{D_\lambda \cdot \bar{N} \cdot \log d_\lambda} = C_\lambda \cdot \frac{V_K \cdot (d_\lambda - 1)}{\bar{N} \cdot \log d_\lambda} \qquad (48$$

Diese Beziehung enthält alle Größen, die in die Bestimmung von $\bar{N}$ eingehen und ermöglicht die Berechnung der Kompensationswiderstände ω_λ in Ohm für die gewünschten mittleren Quantenströme $\bar{N}$ bei der Wellenlänge λ. Zum praktischen Arbeiten empfiehlt es sich daher, die Größe $C_\lambda = 8{,}92 \cdot 10^7 \cdot \lambda / D_\lambda$ zu tabellieren. Die Werte sind in Tab. 7 aufgeführt. Weiter folgt aus Gleichung (48'), daß zur Einmessung eines mittleren Quantenstromes $\bar{N}$ bei den Wellenlängen λ und λ_o bei gleicher Kompensationsspannung V_K sich die Kompensationswiderstände ω_λ und ω_{λ_o} verhalten müssen wie:

$$\frac{\omega_\lambda}{\omega_{\lambda_o}} = \frac{\lambda \cdot (d_\lambda - 1)}{D_\lambda \cdot \log d_\lambda} \cdot \frac{D_{\lambda_o} \cdot \log d_{\lambda_o}}{\lambda_o \cdot (d_{\lambda_o} - 1)} \qquad (49)$$

und daß für zwei verschiedene mittlere Quantenströme $\bar{N}$ und $\bar{N}'$ bei der Wellenlänge λ sich die Kompensationswiderstände ω_λ und ω'_λ verhalten müssen wie:

$$\frac{\omega_\lambda}{\omega'_\lambda} = \frac{\bar{N}'}{\bar{N}} . \qquad (50)$$

Zur Bestimmung von Wirkungsspektren würde prinzipiell die Kenntnis der Gleichungen (49) und (50) genügen, da die zur Erzielung eines bestimmten Effektes notwendigen Quantenströme $\bar{N}$ sowieso rein empirisch ermittelt werden. Das bedeutet, daß zur Bestimmung der Wirkungsspektren eine Eichung des Bolometers nicht erforderlich ist, bzw. daß sich der Eichfehler auf das Ergebnis nicht auswirkt.

h) Versuchsgefäße und Versuchsverlauf

Als Versuchsgefäße wurden rechteckige Kastengefäße (2,4 · 3,6 · 1,5 cm) mit ein oder zwei Birnen und einem Volumen von 16,5...18,5 cm^3 verwendet. In den Hauptraum der Gefäße kamen 3 cm^3 der zu bestrahlenden Zellsuspension bei einer Zelldichte von $w = (0{,}2...0{,}5) \cdot 10^{-3}$, in die Birne 0,5 cm^3 Suspension des sexuell voll aktiven Testklons bei $w = (8...14)\ 10^{-3}$. Zum Schutz gegen Streulicht wurden die Birnen mit schwarzen Gummihütchen überzogen. Die verwendeten Manometer waren die gleichen wie unter VIII a. Geschüttelt wurde ebenfalls wie unter VIII a vermerkt und zwar so, daß der Lichtstrahl stets ganz in den Hauptraum der Manometriegefäße fiel. Da sowohl die Gefäßbodenfläche (= 2,4 · 3,6 = 8,65 cm^2) wie auch die Strahlungseintrittsfläche (= π cm^2) bei allen Gefäßen gleich waren, erhielt bei gleicher Beschickung der Gefäße und Einstrahlung gleicher mittlerer Quantenströme $\bar{N}$ jede Zelle im zeitlichen Durchschnitt bei fraktionierter Belichtung den gleichen Lichtgenuß. Die Einmessung von $\bar{N}$ erfolgte dabei nach Gleichung (48'), jedoch wurde in Fällen, in denen die Strahlungsabsorption in der Zellsuspension unter 5 % blieb, der Quotient $(d_\lambda - 1)/\log d_\lambda$ gleich 1 gesetzt, d. h. die Absorption wurde nicht berücksichtigt. Zu gewünschter Zeit wurde die Birne mit den Testzellen eingekippt. 1...2 h später wurde fixiert. Die Auswertung erfolgte nach dem Paarungstest (III 5) und den in XII 1 entwickelten Formeln. Die Versuchstemperatur war durchweg 20 ± 0,05 °C.

4. Dosis-Effekt-Kurven

a) bei konstantem Quantenstrom und variierter Expositionszeit

Da für die sexuelle Aktivierung durch sichtbare Strahlung das Reizmengengesetz nicht erfüllt ist (s. X 4), mußte zunächst festgestellt werden, wie lange ein mittlerer Quantenstrom $\bar{N}$ einwirken muß, damit eine gute Wirkung erzielt wird. In Abb. 39 sind einige Versuche angegeben, die es gestatten, diese Frage für ♀ zu entscheiden. Es sind im Prinzip Versuche, bei denen die verabreichte Dosis $\bar{D}$ bei konstantem mittlerem Quantenstrom $\bar{N}$ (in mm^3 Quanten/min) durch Variation der Expositionszeit t (in min) verändert wurde. Die Versuche sind an 2 verschiedenen im 14 h:10 h L:D-Wechsel angezüchteten Kulturen durchgeführt. Der Zeitpunkt des Belichtungsbeginns = B und der Zeitpunkt, bei dem die Test-♀ eingekippt wurden = M, sind jeweils als Zellzeit (s. III 9) angegeben. Dabei wurde der Einfluß gelber (589 nm), dunkelroter (744 nm) und weißer (HNW) Strahlung geprüft. Das gelbe Licht ($\bar{N}$ = 0,26) der Wellenlänge 589 nm hat mit anwachsender Expositionszeit t, gemessen an der Paarungsrate, gut gesicherten fördernden Einfluß, sowohl z. Zt. des ersten Dunkelgametenminimums (M = + 13 h), wie auch z. Zt. des ersten Dunkelgametenmaximums (M = 0 h). Der Wirkungsabfall bei sehr langer Einwirkung der Strahlung ist nicht gesichert. Der Einfluß weißer Strahlung (1100 Lux von HNW 120 = Kulturintensität) ist ähnlich wie der gelber. Bei der Prüfung des Einflusses von dunkelroter Strahlung (λ = 744 nm) bei M = + 11,3 h konnte bis zu einer Maximaldosis von $\bar{D} = \bar{N} \cdot t$ = 10,4 · 60 = 624 mm^3 Quanten keine Förderung erzielt werden. Vielmehr zeigte sich bei M = 0 h der hemmende Einfluß derselben. Die Hemmung nimmt bei N = 0,42 mm^3 Quanten/min mit zunehmender Zeit der Einwirkung (bis t = 170 min geprüft) zu. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu dem der Abb. 34 b. Dort verschwindet die durch eine Dosis von 0,52 bis 2,08 mm^3 Quanten erzielte Hemmung bei weiterer Vergrößerung der Dosis (bis 13 mm^3 Quanten geprüft). Der Grund für diesen Unterschied ist darin zu suchen, daß im einen Fall bei gleichem Mischzeitpunkt M und konstantem Quantenstrom $\bar{N}$ die Dosis durch Variation der Belichtungszeit t

variiert wurde, im anderen aber war M nicht gleich und die Dosis wurde bei konstanter Belichtungszeit durch Variation des Quantenstroms $\bar{N}$ variiert. Die unterschiedliche Reaktion der Θ-Zellen auf dunkelrote Strahlung kann hiernach am besten erklärt werden, wenn man annimmt, daß die Dunkelrotempfindlichkeit des Systems in den Stunden vor dem erwarteten Tagbeginn stark abfällt. Daß diese Annahme richtig ist, wird weiter unten gezeigt werden (s. XIII 1). Trotz dieser Schwierigkeit kann aus den Versuchen der Abb. 39 entnommen werden, daß für die Bestimmung von Dosis-Effekt-Kurven bei variiertem $\bar{N}$ und konstantem t, bei 20 °C ein t von 30 min günstig ist. Für M = 0 h ist nach dieser Zeit bei weißem und gelbem Licht die erreichbare Paarungsrate bereits eingespielt. Die Versuche bei M = + 13 h zeigen aber, daß die Endkonzentration des Kontrollsubstrates X erst nach einer Belichtungszeit von etwa 60 min erreicht wird. Auch zur Erfassung des hemmenden Einflusses von dunkelroter Strahlung der Wellenlänge λ = 744 nm ist für M = 0 h eine Belichtungsdauer von t = 30 min ausreichend, obwohl hier bei größeren Belichtungszeiten wesentlich bessere Effekte auftreten. Es fragt sich, ob hierfür Unterschiede im Reaktionsmechanismus verantwortlich sind. Bei dem Versuch mit $\bar{N}$ = 0,26 mm^3 Quanten/min bei λ = 589 nm und M = 13 h beträgt nach t = 18 min G/G_p = 1,9 % und nach t = 60 min G/G_p = 8,0 %. Das entspricht nach Gleichung (14) einem Verhältnis der Konzentrationsunterschiede des Kontrollsubstrates X von $(c_{60} - c_d)/(c_{18} - c_d)$ = 3,60/2,92 = 1,23 bei einem Zeitverhältnis von 3,3/1. Der entsprechende Versuch mit weißem Licht liefert für das Verhältnis der Konzentrationsunterschiede von X den Wert 6,48/5,44 = 1,20. Es wird also in 3,3-facher Zeit nur rund das 1,2-fache an X synthetisiert. Das Einspielen des Endtiters erfolgt also nach einem Reaktionsmechanismus 3. Ordnung. Berücksichtigt man die Rückreaktion als eine Reaktion 1. Ordnung (s. X 2), so muß man - gleiche Größenordnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten vorausgesetzt - für die Synthese der sexuellen Affinität eine Schrittmacherreaktion 2. Ordnung annehmen, d. h. die Synthesegeschwindigkeit hängt unter den gegebenen Bedingungen von der Konzentration zweier Substanzen ab. Bei dem Versuch mit $\bar{N}$ = 0,42 mm^3 Quanten/min bei λ = 744 nm und M = 0 h dagegen kommt

man zu einem anderen Ergebnis. Hier ergibt sich für $(c_{60} - c_d)/(c_{20} - c_d) = 0{,}92/0{,}22 = 4{,}2$ und für $(c_{180} - c_d)/(c_{60} - c_d) = 2{,}45/0{,}92 = 2{,}7$. Berücksichtigt man wieder die Rückreaktion und zusätzlich den Empfindlichkeitsabfall, erkennt man, daß die Konzentration des Kontrollsubstrates X durch einen konstanten Quantenstrom Dunkelrot in gleichen Zeiten um den gleichen Betrag erniedrigt wird. Diese funktionelle Beziehung läßt darauf schließen, daß die dafür verantwortlichen physiko-chemischen Prozesse einer Reaktion O. Ordnung gehorchen. Damit reagiert die Chlamydomonaszelle bezüglich der sexuellen Aktivität auf dunkelrote Strahlung ähnlich wie die Öffnungsbewegung des Plumula-Hakens bei Phaseolus (s. WITHROW et al.[159]) oder die Chloroplastendrehung bei Mougeotia (s. HAUPT[54]). Eine solche Abhängigkeit würde z. B. erreicht, wenn dunkelrote Strahlung ein Ferment aktiviert, welches die Konzentration eines Substrates V, das an der Synthese der sexuellen Affinität beteiligt ist, erniedrigt. Es würde dann - sofern die Konzentration des aktiven Ferments bei der Umsetzung der limitierende Faktor ist - in gleichen Zeiten gleich viel von dem fraglichen Substrat V umgebaut werden.

b) bei konstanter Expositionszeit und variiertem Quantenstrom

Im folgenden wird untersucht, wie die sexuelle Aktivität von im 14 h:10 h L:D-Wechsel angezüchteten ♀-Kulturen durch Strahlung verschiedener Wellenlängen beeinflußt wird. Dabei wurde bei konstant gehaltener Belichtungsdauer t = 30 min der mittlere Quantenstrom $\bar{N}$ variiert. Jeweils bei Belichtungsende wurden die Test-♀ eingekippt. Dieser Zeitpunkt = M liegt verschieden. Die Versuche sind in Diagrammen (Abb. 40) dargestellt, in denen gegen die Logarithmen der Quantenströme $\bar{N}$ die nach Gleichung (26) berechneten Konzentrationsunterschiede des Kontrollsubstrates X aufgetragen sind. Werte, die gleichzeitig am gleichen Material gewonnen sind, sind verbunden. Aussagen über die Wirkungsstärken der einzelnen Wellenlängen lassen sich aus den Diagrammen nicht entnehmen, da sowohl M wie auch G_p und G_d von Versuch zu Versuch wechseln. Z. Zt. des Dunkel-

gametenminimums bzw. z. Zt., bei der ein Zwischengipfel (s. XI) durch Licht induziert werden kann, d. h. für M = + 13,0...+ 13,3 h wächst bei den Wellenlängen 400...589 nm die Konzentration des Kontrollsubstrates X etwa proportional dem Logarithmus des Quantenstromes an. Auch für 668 nm kann man für M = + 13 h eine solche Abhangigkeit annehmen. Für 744 nm hingegen ist bei M = + 13 h keine Wirkung mehr zu sichern. Z. Zt. des Dunkelgametenminimums, genauer für M ≈ + 13 h sind also die Voraussetzungen zur Anwendung der Gleichung (30') bis zu Quantenströmen von $\bar{N} \leq 1$ mm^3 Quanten/min gegeben, d. h. es kann das Wirkungsspektrum bestimmt werden. Z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns, d. h. für M = 0 h bzw. zu einem Zeitpunkt, bei dem der Abfall des Dunkelgametentiters beginnt, findet man bei den Wellenlängen 400...608 nm ein grundsätzlich abweichendes Verhalten. Für λ = 608 nm z. B. besteht bei M = 0 h für niedere Quantenströme $\bar{N} < 10^{-2}$ mm^3 Quanten/min zwar eindeutig fördernde Wirkung, wobei sogar die Lichtempfindlichkeit d c / d log $\bar{N}$ der Zellen etwa gleich ist, wie bei M = + 13 h. Bei weiterem Anstieg des Quantenstroms tritt aber ein starker hemmender Einfluß auf, der in seiner Größe etwa der Differenz der Logarithmen der Quantenströme proportional ist. Legt man den Versuchszeitpunkt in den Bereich, in dem der Dunkelgametentiter abfällt, also etwa M ≥ 0,3 h, so findet man ein indifferentes Verhalten. Bei Vergrößerung von M auf + 2,0 h erhält man bei 608 nm wieder ein dem Logarithmus der Quantenströme proportionales Anwachsen des Kontrollsubstrates X, wie es für das Dunkelgametenminimum charakteristisch ist. Ähnliche Verhältnisse findet man bei λ = 400, 461, 508 und 589 nm. Abweichend verhalten sich die Effekte bei 668, 725 und 744 nm. Hier besteht von niedersten Quantenströmen ab für M → 0 h ein hemmender Einfluß, der ebenfalls als der Differenz der Logarithmen der Quantenströme proportional angesehen werden kann. Mit dem Verschwinden der Dunkelgameten, d. h. für M > + 2,0 h kann bei 725 und 744 nm kein Effekt mehr nachgewiesen werden. Für λ = 668 nm aber zeigt sich bei M = + 0,9 h plötzlich eine Förderung, die jedoch bei höheren Quantenstromen wieder verschwindet. Z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns, d. h. für M ≈ 0 h, kann

man wegen der Wirkungsumschläge ein Wirkungsspektrum unter Anwendung der Gleichung (30') also nur bestimmen, wenn die angewendeten Quantenströme $\bar{N} \leq 10^{-2}$ mm^3 Quanten/min sind. Um auch ein Wirkungsspektrum für den bei großen Quantenströmen auftretenden hemmenden Einfluß zu erhalten, wäre es notwendig, die zwischen 2 sehr hohen Quantenströmen (etwa $\bar{N}_1 = 1$ mm^3 Quanten/min und $\bar{N}_2 = 10$ mm^3 Quanten/min) auftretenden Konzentrationsunterschiede des Kontrollsubstrates X für jeweils 2 Wellenlängen zu erfassen. Hierzu wäre eine Apparatur mit mindestens vier monochromatischen Strahlengängen erforderlich auf Grund der nachfolgenden Experimente hat sich die Bearbeitung dieser Fragestellung jedoch erübrigt. Ändert man die Versuche nämlich so ab, daß man die Test-♀ bei Belichtungsbeginn einkippt (M = B), d. h. M ist jetzt bei gleicher Lage der Belichtungsphase 30 min kleiner, so findet man für die Wellenlängen < 668 nm auch bei hohen Quantenströmen $\bar{N}$ z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns keinen Umschlag zur Hemmung, wogegen für $\lambda > 668$ nm auch in dieser Anordnung schon bei niederen Intensitäten Hemmung nachweisbar ist. Zur Demonstration dienen die folgenden Wertepaare, die jeweils am gleichen Material mit den beiden Methoden gewonnen sind. Für $\lambda = 608$ nm ergab sich, mit t = 30 min und $\bar{N} = 1{,}04$ mm^3 Quanten/min (unter Berücksichtigung der Absorption berechnet nach Formel (48')) bei B = M = − 0,4 h: $G/G_p = 99 \pm 6$ % bei $G_d/G_p = 75 \pm 5$ %, dagegen bei B = − 0,4 h und M = + 0,1 h: $G/G_p = 66 \pm 5$ % bei $G_d/G_p = 66 \pm 5$ %. Für $\lambda = 725$ nm entsprechend mit t = 30 min und $\bar{N} = 0{,}104$ mm^3 Quanten/min bei B = M = − 0,2 h: $G/G_p = 51 \pm 5$ % bei $G_d/G_p = 63 \pm 5$ %, dagegen bei B = − 0,2 h und M = + 0,3 h: $G/G_p = 17 \pm 2$ % bei $G_d/G_p = 51 \pm 5$ %. Solche Versuche zeigten eindeutig, daß bei allen Wellenlängen, bei denen z. Zt. des erwarteten Tagbeginns mit der Methode der Vorbelichtung die anfangs mit der Intensität zunehmende Förderung plötzlich bei höheren Intensitäten in eine entsprechende Hemmung umschlägt, dieser Hemmung keine primäre Hemmung ist. Die Hemmung kommt immer über eine vorher gehende starke Förderung zustande, die wegen der Rückreaktion beim Einmischen der Test-♀ nach Belichtungsende nicht mehr gefaßt werden kann. Auch im Agglutinationstest läßt sich dieses Phänomen nachweisen. Man muß also damit rechnen,

daß das Wirkungsspektrum für die Hemmung der Kopulation - bestimmt mit der Methode der Vorbelichtung z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns - im Bereich $\lambda < 668$ nm identisch ist mit dem für die Förderung. Das spricht dafür, daß zur sexuellen Aktivierung der Zellen eine spezifische Vorstufe V verbraucht wird, die nur in begrenzter Konzentration zur Verfügung steht. Trifft dies zu, so sollte es auch z. Zt. des Dunkelgametenminimums möglich sein, durch Vorbelichten mit hohen Dosen diesen Vorstufen"pool" zu erschöpfen. Ein Versuch mit λ = 589 nm, d. h. mit einer Wellenlänge großer Wirkungsstärke bezüglich der sexuellen Aktivierung gibt einen Hinweis hierfür. Da der erzielbare Quantenstrom $\bar{N}$ begrenzt ist, wurde die Belichtungsdauer auf t = 65 min erhöht. Bei einer Kultur mit einem potentiellen Gametentiter von G_p = 86 $\pm$ 10 % und einem Dunkelgametentiter G_d/G_p = 4,5 $\pm$ 1,2 % z. Zt. M = + 14,8 h findet man nach Vorbelichtung mit $\bar{N}$ = 1,04 mm^3 Quanten/min für G/G_p = 85 $\pm$ 3 %, nach Vorbelichtung mit $\bar{N}$ = 5,2 mm^3 Quanten/min dagegen nur noch G/G_p = 75 $\pm$ 3 %. Dieser Abfall bei der höheren Dosis ist mit P $\approx$ 98 % schwach gesichert. Man kann also annehmen, daß auch z. Zt. des Dunkelgametenminimums eine zur Synthese der sexuellen Affinität notwendige spezielle Vorstufe V nur in begrenzter Konzentration zur Verfügung steht und daß gewisse Spektralbereiche keinen Einfluß auf die Auffüllung dieses Vorstufen"pools" haben. Davon unabhängig zeigt das Ergebnis, daß es auch z. Zt. des Dunkelgametenminimums durch Belichten mit monochromatischer Strahlung prinzipiell möglich ist, hohe Paarungsraten zu erzielen.

Die Hemmungen der Kopulationsfähigkeit, die nach Bestrahlung mit Dunkelrot auftreten, sind dagegen primäre Hemmungen. Sie lassen sich ebenfalls im Agglutinationstest nachweisen. Sie könnten erklärt werden durch eine direkte Hemmung der Gamonsynthese oder durch Konzentrations- oder Aktivitätserniedrigung eines Substrates oder Fermentes, welches bei der Synthese der sexuellen Affinität beteiligt ist.

Von besonderem Interesse sind diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Arbeit von EHRET[28] über die Beeinflussung der Gruppenbildung (mating reaction) bei Paramaecium bursaria durch Belichtung. Bei diesem Objekt ist nach einer Vorbelichtung im ersten Teil des diurnalen Aktivitätsrhythmus die Zahl der sich bildenden Gruppen erhöht; nach einer Vorbelichtung gegen Ende der Reaktionsperiode jedoch vermindert. Das Wirkungsspektrum, das für Riboflavin bzw. ein Flavoproteid als Photorezeptor spricht, scheint in beiden Fällen das gleiche zu sein. Nachdem die Dauer der angewendeten Vorbelichtung etwa 2 h betrug, ist es denkbar, daß die beobachtete Gruppenverminderung auch hier über eine vorhergegangene Förderung zustande kommt, d. h. daß bei der lichtaktivierten Synthese der "mating substance" eine nur in begrenzter Konzentration verfügbare Vorstufe schneller aufgebraucht wird. Die "mating substance" selbst,müßte dabei in vivo eine Rückreaktion zeigen, ähnlich wie die Gamone bei Chlamydomonas. Auf die Möglichkeit, daß die Konzentration einer Vorstufe der "mating substance" durch das endodiurnale System der Zelle reguliert wird, hat EHRET[28] bereits hingewiesen.

5. Das Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung, bestimmt z. Zt. des diurnalen Aktivitätsmaximums und -minimums

a) Methodik

Zur Bestimmung der Wirkungsspektren der sexuellen Aktivierung wurde die Wellenlänge 589 nm als Bezugswellenlänge λ_o gewählt. Mit der Dreistrahlapparatur (Abb. 37) konnten dabei gleichzeitig am gleichen Material zwei Wellenlängen in ihrer Wirkung mit der Bezugswellenlänge λ_o verglichen werden. Das Wirkungsspektrum wurde an im 14 h:10 h L:D-Wechsel gezüchtetem Material bestimmt, einmal z. Zt. des Dunkelgametenmaximums, d. h. bei B = 0 h und einmal zur Zeit des Dunkelgametenminimums bei B = + 13 h. Die Expositionszeit war stets t = 30 min. Der verwendete Quantenstrom war für B = + 13 h bei allen Wellenlängen konstant $\bar{N}$ = 0,52 mm^3 Quanten/min. Für B = 0 h war entsprechend $\bar{N}$ = 0,01 mm^3 Quanten/min. Jede Wel-

lenlänge λ wurde in ein bis sechs Versuchen angeschlossen. Es waren in der Regel Versuche mit Vorbelichtung, d. h. die Testzellen wurden bei Belichtungsende eingekippt; es war also M = B = +0,5 h. Bei den Wellenlängen mit großer Wirkungsstärke wurden jeweils auch ein bis drei Versuche durchgeführt, bei denen die Testzellen bei Belichtungsbeginn eingekippt worden waren. Auf diese Weise ist ein Wirkungsumschlag durch Vorstufenverbrauch ausgeschlossen worden. Die Wirkungsstärken wurden nach der Formel (30') berechnet, wobei auf Grund der Dosis-Effekt-Kurven aus Abb. 40 für a/n = 1 gesetzt wurde. Die nach Formel (10) bestimmten Auswertungsfehler wurden für jede W_λ =Bestimmung auf Wirkungsstärkeneinheiten transformiert. Bei Quotientenbildung wurde die Summe der relativen Fehler von Zähler und Nenner angegeben. Lagen bei einer Wellenlänge mehrere Bestimmungen mit verschiedener Genauigkeit vor, so wurden sie entsprechend den ihnen zukommenden Gewichten g_i zu einer mittleren Wirkungsstärke $\bar{W} \pm \bar{\sigma}$ umgerechnet, wobei $g_i = 1/\sigma_i^2$; $\bar{W} = \sum g_i \cdot W_i / \sum g_i$ und $\bar{\sigma}^2 = \sum g_i \cdot \sigma_i^2 / g_i$. Vergleichsweise wurde der mittlere Fehler s auch nach

$$s^2 = \sum (W - \bar{W})^2 / n\,(n-1) \qquad (51)$$

berechnet. Es traten lediglich zufällige Unterschiede zwischen $\bar{\sigma}$ und s auf. Andere Fehlerquellen als die in Formel (10) berücksichtigten spielen demnach nur eine untergeordnete Rolle.

b) Ergebnisse

Gelbes Licht der Wellenlänge λ = 589 nm hat in einer Dosis von $\bar{N} \cdot t = 0{,}52 \cdot 30 = 15{,}6$ mm^3 Quanten an ♁ um B = + 13 h im Mittel einen Konzentrationsunterschied des Kontrollsubstrates X von (s. Gleichung(26)) $c - c_d = (1{,}41 \pm 0{,}08)a$ induziert. Entsprechende Versuche an ♀ (mit ♁ als Testklon) lieferten für $c - c_d = (1{,}08 \pm 0{,}06)a$. Die ♀ sprechen also z. Zt. des Dunkelgametenminimums auf gelbes Licht etwas schlechter an als ♁.

Die Wirkungsspektren für ⊕ sind in Abb. 41 a dargestellt. Die Fehler sind bei dem Wirkungsspektrum für B = 0 h etwa doppelt so groß wie bei dem für B = 13 h. Dies ist durch zwei Faktoren bedingt. Im ersten Fall sind der verwendete Quantenstrom und damit auch die erzielten Paarungsratenunterschiede kleiner. Außerdem ist z. Zt. B = 0 h der Dunkelgametentiter G_d/G_p meist>50 %. Dies bedingt bei der Bestimmung großer Wirkungsstärken häufig Paarungsraten G/G_p> 80 %. Dann wird aber d (G/G_p) / d c sehr klein und der Fehler von W_λ entsprechend groß. Die Wirkungsspektren für B = 0 h bzw. B = + 13 h stimmen in den Spektralbereichen 508...608 nm und 647...801 nm gut überein. Es wäre prinzipiell möglich, in anderen Spektralbereichen gute Übereinstimmung zu erzielen, indem man die Wirkungsstärken eines Spektrums mit einem konstanten Faktor durchmultipliziert. Die gute Übereinstimmung im Bereich 508...608 nm (grün...orange) erscheint aber gerade erstrebenswert, da dieser Spektralbereich geringe photosynthetische Aktivität besitzt und nach den bisherigen Erfahrungen an pflanzlichen Objekten nur geringe formative Wirkung zeigt. Es ist also sehr unwahrscheinlich, daß sich in diesem Bereich Wirkungen von mehreren Pigmenten überlagern. Auf dieser Überlegung basierend können - wie das Differenzspektrum der Abb. 41 b demonstriert - zwischen B = 0 h und B = + 13 h Wirkungsunterschiede im blauen (400...467 nm) und hellroten (627 nm) Spektralbereich gesichert werden. Im Gegensatz zu den hoch signifikanten Unterschieden im blauen und hellroten Spektralbereich erreicht die Differenz bei λ = 546 n nur die Warngrenze. Daß im dunkelroten Spektralbereich für B = 0 h kein hemmender Einfluß gesichert werden konnte, liegt daran, daß der angewendete Quantenstrom zu klein war und wie weiter unten (XIII 1) gezeigt wird, die Dunkelrotempfindlichkeit der Zellen zu dieser Zeit sehr gering ist.

Unter den gleichen Bedingungen wie bei ⊕ wurden auch für ♀ die Wirkungsstärken einiger Wellenlängen bestimmt. Wegen des hohen Dunkelgametentiters von ♀ (s. Abb. 23) waren jedoch nur Bestimmungen z. Zt. B = + 13 h möglich. Die erhaltenen Werte (Tab. decken sich - bis auf den Wert für λ = 627 nm, welcher auffallend nach unten abweicht - innerhalb der Fehlergrenzen mit denen von ⊕.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse über Schwankungen im Wirkungsspektrum von ♀ kann man nur schließen, daß das Licht tageszeitlich wechselnd über verschiedene Pigmente einen Einfluß auf die sexuelle Aktivität von ♀ ausübt. Die Identifizierung der beteiligten Photorezeptoren und die Interpretation der Schwankungen im Wirkungsspektrum bedarf noch weiterer systematischer Untersuchungen. In dieser Hinsicht schien vor allem der hemmende Einfluß dunkelroter Strahlung von Interesse; er wird daher nachfolgend genauer analysiert.

XIII. Die Niederenergiereaktion

1. Schwankungen der Dunkelrotempfindlichkeit

Bereits unter XII 4 a wurde auf Grund der widersprechenden Ergebnisse der Abb. 34 b und 39 die Vermutung geäußert, daß die Dunkelrotempfindlichkeit bei ♀-Zellen, die im L:D-Wechsel angezüchtet sind,-vor dem erwarteten Belichtungsbeginn abfällt. Die Bestätigung hierfür bringen Versuche, bei denen zu verschiedenen Zeiten vor dem erwarteten Belichtungsbeginn eine konstante Quantendosis der Wellenlänge 744 nm eingestrahlt wurde und der Gametentiter z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns (Z = 0 h) bestimmt wurde. Der angewendete Quantenstrom war $\bar{N}$ = 1,04 mm^3 Quanten/min, die Belichtungszeit t = 60 min, die Dosis also konstant $\bar{D}$ = 62,4 mm^3 Quanten. Ist G_B/G_p die bei M = 0 h und F = + 2 h erhaltene Paarungsrate, wenn die Dosis $\bar{D}$ ab B = x h verabreicht wurde und $G_{B'}/G_p$ die bei M = 0 h und F = + 2 h erhaltene Paarungsrate, wenn die Dosis $\bar{D}$ ab B' = - 3 h eingestrahlt wurde, so läßt sich das Verhältnis der jeweils erzielten Konzentrationsunterschiede des Kontrollsubstrates X nach Gleichung (26) angeben als:

$$\frac{c_B - c_d}{c_{B'} - c_d} = - \frac{\text{Probit } G_B/G_p - \text{Probit } G_d/G_p}{\text{Probit } G_{B'}/G_p - \text{Probit } G_d/G_p} \qquad (52)$$

Das Ergebnis von nach Gleichung (52) ausgewerteten Versuchen ist in Abb. 42 dargestellt. In der Abzisse ist der Zeitpunkt

des Belichtungsbeginns = B als Zellzeit aufgetragen. Es ist einwandfrei ersichtlich, daß sich z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns die größte Hemmung in der Paarungsrate manifestiert, wenn die Dosis-Dunkelrot etwa drei bis zwei Stunden vorher eingestrahlt wird. Bei B = B' = - 3,0 h ergab sich als Mittel für $c - c_d$ = (- 1,22 ± 0,08) a. Gibt man die Dosis Dunkelrot schon 4...8 h vor (B= - 8...- 4 h) oder erst z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns (B = 0 h), so läßt sich keine Wirkung mehr sichern. Auch wenn man die bei B = 0 h eingestrahlte Dosis von 62,4 mm^3 Quanten auf 1/10 heruntersetzt oder bis aufs 10-fache steigert und die Test-♀ erst um M = + 3,0 h einkippt, läßt sich keine Hemmung nachweisen. Bei noch höherer Dosis erscheint sogar fördernder Einfluß (s. hierzu XIV). Damit ist einwandfrei gesichert, daß die ♀-Zellen für eine Hemmung der sexuellen Aktivität durch dunkelrotes Störlicht etwa 3 h vor Belichtungsbeginn am empfindlichsten sind. Es handelt sich also keinesfalls um einen einfachen Lauf- oder Reaktionszeiteffekt. Die Diskrepanz zwischen den Versuchen der Abb. 34 b und 39 ist somit auf der Basis der Schwankung der Dunkelrotempfindlichkeit erklärt.

2. Hinweise für eine Phasenverschiebung der Rhythmik durch Störlicht

Strahlt man die Dosis Dunkelrot von 62,4 mm^3 Quanten in den ersten Nachtstunden, d. i. bei B = - 10...- 8 h ein, so hat dies ein gesichertes (P ≈ 99,73 %) Ansteigen des Gametentiters z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns zur Folge (s. Abb. 42). Diese Förderung durch Dunkelrot läßt sich, wie der Versuch der Abb. 43 a zeigt, auch noch um M = + 5 h fassen, wenn man die gleiche Dosis ab B = - 6,0 h bei einer Expositionszeit t = 120 min verabreicht. Der verzögerte Abfall des Gametentiters weist auf eine Phasenverschiebung der Rhythmik. Der Versuch der Abb. 43 b zeigt, daß sogar 1/3 der Dosis bei λ = 744 nm von B = - 9,5 h ab und t = 180 min noch zur Phasenverschiebung der Rhythmik ausreicht. Allerdings ist dies nur am zweiten Dunkelgameten

maximum zu erkennen. Das erste Gametenmaximum erscheint nach dieser kleinen Dosis Dunkelrot etwas erniedrigt. Ein Parallelversuch, bei dem das Material mit einer etwa 20-fachen Dosis Hellrot der Wellenlänge λ = 647 nm belichtet worden war, zeigt am ersten Gametenmaximum einen Vorgipfel und einen etwas späteren Abfall. Das zweite Gametenmaximum erscheint deutlich verzögert und kleiner.

Diese Versuche zeigen, daß man auch bei Chlamydomonas durch Einstrahlung relativ kleiner Dosen monochromatischen Störlichtes eine Phasenverschiebung der endogenen Tagesrhythmik erhalten kann. Die weitere Analyse dieses Phänomens, z. B. die Ausarbeitung des Wirkungsspektrums der Phasenverschiebung soll jedoch an dieser Stelle unterbleiben. Um einer Erklärung des Differenzspektrums (Abb. 41 b) näher zu kommen, schien es sinnvoller, zuerst die durch Störlicht erzielte Hemmung der sexuellen Aktivität weiter zu bearbeiten.

3. Dosis-Effekt-Kurven für den Einfluß von Störlicht auf die sexuelle Aktivität

a) bei variierter Expositionsdauer

An ♀ (im 14 h:10 h L:D-Wechsel angezüchtet) wurden Versuche durchgeführt, bei denen ab B = - 3,0 h, d. h. im Bereich der größten Dunkelrotempfindlichkeit, verschieden lang mit einem konstanten Quantenstrom von $\bar{N}$ = 0,208 mm^{3} Quanten/min bei der Wellenlänge λ = 744 nm belichtet wurde und der Gametentiter z. Zt. des Gametenmaximums (M = 0 h, F = + 2 h) bestimmt wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 44 festgehalten. Unerwartet ist der Befund, daß nach einer Expositionsdauer von t = 15 min durch Dunkelrot geringe Förderung erzielt wird.* Der hauptsächlich interessierende gegenläufige Prozeß scheint - in

*Ein ähnlicher Effekt ist z. B. von HAUPT[55] bei der Chloroplastenbewegung von Mougeotia beobachtet worden.

Übereinstimmung mit dem aus Abb. 39 in XII 4 a gezogenen Schluß - der Dauer der Belichtung proportional zu sein. Es ist nicht ausgeschlossen, daß diese Abhängigkeit nur zustande kommt, weil es sich bei den Belichtungen um fraktionierte Belichtungen handelt (vergl. hierzu HAUPT et al.[56]). Unabhängig von diesem Problem erscheint es auf Grund der in Abb. 44 gegebenen Abhängigkeit nicht ratsam, mit Störlichtphasen < 30 min zu arbeiten, im Gegenteil, sollte man eher längere Belichtungszeiten anwenden.

b) bei variiertem Quantenstrom

Variiert man den Quantenstrom des eingestrahlten Störlichtes systematisch, so erhält man für ♀ Kurven, wie sie in Abb. 45 dargestellt sind. Für λ = 589 nm, B = - 3,0 h, t = 30 min und Einstrahlung von Quantenströmen $\bar{N} < 5 \cdot 10^{-2}$ mm^3 Quanten/min findet man z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns (M = -1,0 h F = + 1,5 h) ein geringfügiges Ansteigen des Gametentiters. Quantenströme von $\bar{N} = 5 \cdot 10^{-2} \ldots 5$ mm^3 Quanten/min dagegen induzieren eine Erniedrigung des Gametentiters, wobei diese etwa dem Logarithmus der Quantenstrome proportional ist. Die Kurvenäste für Strahlung der Wellenlängen 461 und 508 nm verlaufen parallel zu dem für 589 nm, d. h. diese Wellenlängen wirken über den gleichen Mechanismus. Bei λ = 461 nm ist der Kurvenast - bezogen auf λ = 589 nm - zu kleineren Quantenströmen verschoben, bei λ = 508 nm dagegen zu größeren. Da die Kurven an verschiedenem Material gewonnen sind, kann man hieraus jedoch keine quantitative Aussage über die Wirkungsstärken der drei Wellenlängen entnehmen. Die Dosis-Effekt-Kurven bei λ = 745 nm (1 IL und 2 mm RG 9) und λ = 668 nm zeigen unter sonst gleichen Bedingungen einen andersartigen Verlauf, besonders die Steigung der Kurvenäste im Bereich von Quantenströmen $\bar{N} = 5 \cdot 10^{-2} \ldots 5$ mm^3 Quanten/min ist gesichert kleiner. Man muß also annehmen, daß die Hemmung hier über einen anderen Mechanismus zustande kommt. Durch Versuche, bei denen die Test-♀ unmittelbar bei Belichtungsende (also M = - 2,5 h) eingekippt

wurden, ließ sich zeigen, daß für λ = 461, 508 und 589 nm primär eine Förderung auftritt, während sich für λ = 668 und 745 nm von Anfang an eine mit der Zeit zunehmende Hemmung ausprägt. Die Situation ist also ähnlich wie bei den z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns aufgenommenen Dosis-Effekt-Kurven (s. XII 4 b), und man kann die dort vorgetragene Erklärung hier übernehmen.

In Versuchen mit B = - 6,0 h und t = 30 min bei λ = 589 bzw. 745 nm (Abb. 45) läßt sich bis herauf zu $\bar{N}$ = 10 mm^3 Quanten/min - gemessen an der Paarungsrate z. Zt. des erwarteten Tagbeginns (M = - 1,0 h, F = + 1,5 h) - kein hemmender Einfluß nachweisen. Im Gegenteil, es besteht für Quantenströme von $\bar{N} = 5 \cdot 10^{-3} \ldots 2$ mm^3 Quanten/min - in guter Übereinstimmung mit der Aussage der Abb. 42 - sogar gesicherter fördernder Einfluß.

4. Das Wirkungsspektrum der Hemmung der sexuellen Aktivität durch Störlicht

Auf Grund der Versuche aus XIII 1...3 sind für ♀ bei B = - 3 h, t = 30 min und M $\approx$ 0 h die Voraussetzungen zur Bestimmung eines Störlichtwirkungsspektrums nach Gleichung (30') gegeben. Dabei kann in Näherung mit a/n = 1 gerechnet werden (s. Abb. 45). Um eine Hemmung, die über vorhergehende sexuelle Aktivierung zustande kommt, auszuschließen, ist es notwendig, mit möglichst geringen Quantenströmen zu arbeiten. Nach den Dosis-Effekt-Kurven der Abb. 45 wäre ein Quantenstrom von $\bar{N}$ = 0,05 mm^3 Quanten/min bei t = 60 min wohl am günstigsten. Bei Anwendung so niederer Quantenströme werden aber die durch Dunkelrot induzierten direkten Hemmungen ziemlich klein und die Auswertungsfehler entsprechend groß. Es wurde daher als Kompromiß mit $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min und t = 30 min gearbeitet. Die Bestimmung des Wirkungsspektrums erfolgte analog dem in XII 5 a angegebenen Verfahren mit λ_o = 744 nm als Bezugswellenlänge. Jedoch wurden die Proben ab B = -3,0 h für t = 30 min bestrahlt und die Test-♀ wurden erst z. Zt. M = - 1,0 h eingekippt. Fixiert wurde z. Zt. F = + 1,0 h. Für den durch 744 nm erzielten

Konzentrationsunterschied von X ergab sich dabei: $c - c_d =$ $(- 0,69 \pm 0,13)a$. Außerdem sind noch einige Versuche ausgeführt worden, bei denen unter sonst gleichen Bedingungen ab $B = - 4,0$ h für $t = 300$ min belichtet worden war. Die Proben waren also bis zur Fixierung bei allen Wellenlängen mit gleichem mittlerem Quantenstrom $\bar{N} = 0,208$ mm^3 Quanten/min bestrahlt worden und hatten also gegenüber der ersten Methode die 10-fache Dosis erhalten. Für 744 nm errechnete sich hierbei: $c - c_d =$ $(- 1,35 \pm 0,28)a$. Die mit beiden Methoden gewonnenen Ergebnisse zeigten bezüglich der nach (30') berechneten Wirkungsstärken in keinem Falle eine auffallende Abweichung und wurden daher zur Berechnung des Wirkungsspektrums zusammengeschlagen.

Auch bei ♀ läßt sich prinzipiell der hemmende Einfluß von dunkelrotem Störlicht nachweisen. Jedoch sind ♀ gegenüber Dunkelrot weit unempfindlicher als ⊕. Für 744 nm findet man an ♀ mit ⊕ als Testklon bei $\bar{N} = 0,208$ mm^3 Quanten/min, $B = - 4,0$ h, $t = 300$ min, $M = - 1,0$ h und $F = + 1,0$ h: $c - c_d = (- 0,21 \pm 0,08)a$. Damit berechnet sich nach (30') mit $a/n = 1$ das Verhältnis der Wirkungsstärken zwischen ♀ und ⊕ bei der Wellenlänge 744 nm zu: $W_{744\ ♀} / W_{744\ ⊕} = 0,03 \pm 0,02$. Der hemmende Einfluß von Dunkelrot auf die sexuelle Aktivität von ♀ ist also sehr gering. Deshalb wurde auf eine Bestimmung des Störlichtwirkungsspektrums verzichtet.

Das Wirkungsspektrum der Hemmung der sexuellen Aktivität von ⊕ durch niedere Energien von Störlicht (Abb. 46) hat eine gewisse Ähnlichkeit mit dem aus zahlreichen Untersuchungen erschlossenen Absorptionsspektrum des Dunkelrotpigments ($= P_{DR}$) des reversiblen Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystems (Zusammenfassung bei MOHR[99]). Sehr wichtig ist die Tatsache, daß bei dem hier ermittelten Wirkungsspektrum die Wirkung bei 705 bzw. 801 nm nur noch einen Bruchteil der Wirkung des Maximums beträgt. Dadurch ist nämlich sowohl ein unspezifischer IR-Effekt wie auch eine Identität mit dem Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem (s. MOHR[99]) ausgeschlossen. Ein kleiner Gipfel im Bereich von 630 nm ist für P_{DR} schon des öfteren gefunden worden, so z. B. von WITHROW et al.[159] für die versibilisierung der durch Hellrot induzierten Öffnungsbewegung des isolierten "Plumula-Hakens" der Dunkelkeimlinge von Phase-

olus vulgaris. Daß im Bereich um 590 nm keine Hemmung auftritt, ist ein Beweis dafür, daß es unter den hier angewendeten Niederenergie-Bedingungen tatsächlich gelungen ist, im gelben Bereich eine Nebenwirkung über Vorstufenverbrauch durch direkte Aktivierung auszuschalten. Damit kann auch der hemmende Einfluß des blauen Spektralbereichs nur zu geringem Teil über direkte Aktivierung zustande gekommen sein. Dies wird weiterhin dadurch gestützt, daß die Blaulichthemmung bis herunter zu 400 nm sehr stark in Erscheinung tritt. Ähnliche Blaulichteffekte sind auch von chlorophyllfreien Objekten wie Samen oder Sporen bekannt. So hat z. B. MOHR[96] für die Hemmung der durch Hellrot induzierten Keimung von Farnsporen ebenfalls einen starken Blaulichteffekt gefunden. Deshalb und aus rein energetischen Gründen (vergl. hierzu LATIMER et al.[78]) ist es unwahrscheinlich, daß der hier beobachtete starke Blaulichteffekt durch Fluorescenz des Chlorophylls ausgelöst wird. Prüfenswert scheint hingegen, ob die Blaulichthemmungen auf Strahlungsabsorption im Riboflavin zurückgeführt werden können. Diese Frage konnte aus apparativen Gründen vorerst nicht verfolgt werden.

5. Die Steuerung der sexuellen Aktivität durch das reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem.

Das Wirkungsspektrum der Hemmung der sexuellen Aktivität durch Störlicht (Abb. 46) legt es nahe zu prüfen, ob das weit verbreitete Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem an der Steuerung der sexuellen Aktivität von Chlamydomonas beteiligt ist.

a) Methodik

Zur Bearbeitung dieser und einiger anderer Fragestellungen war es günstig, das Material gleichzeitig mit zwei verschiedenen Wellenlängen belichten zu können. Die Monochromatoranlage (Abb. 37) wurde zu diesem Zweck unter Verwendung einer zweiten Strahlungsquelle (OSRAM 8032, 12 V 100 W, über Regeltrafo und Konstanthalter betrieben) in der in Abb. 47 angegebenen Weise abgeändert. Die bolometrische Justierung der Strah-

lengänge erfolgte so, daß zuerst der Strahlengang 2 bezüglich der von Lampe 1 ausgefilterten Strahlung eingestellt wurde. Dann erfolgte dasselbe bei unveränderter Blendeneinstellung im Strahlengang 2 für die von Lampe 2 gelieferte Strahlung. Danach wurden in den Strahlengängen 1 und 3 bei unveränderter Brennspannung der Lampen durch Regulierung der zugehörigen Irisblenden die gewünschten Werte eingemessen. Die Justierung war so, daß im Strahlengang 1 und 2 bei der Wellenlänge 725 nm jeweils ein Quantenstrom von $\bar{N} = 0{,}149$ mm^3 Quanten/min eingestrahlt wurde. Im Strahlengang 2 wurde zusätzlich der gleiche Quantenstrom bei der Wellenlänge λ eingestrahlt, im Strahlengang 3 dieser alleine. An Proben der gleichen Φ-Suspension wurden die folgenden Bestrahlungsprogramme durchgeführt: Eine Probe (= 1) wurde ab Z = - 3,0 h mit dunkelroter Strahlung der Wellenlänge 725 nm belichtet. Eine zweite Probe (= 2) wurde gleichzeitig mit der Wellenlänge (z. B. = 627 nm) belichtet. Z. Zt. Z = - 2,5 h wurden die Proben 1 und 2 gegeneinander ausgetauscht, d. h. jetzt erhielt die Probe 1 Strahlung der Wellenlänge λ und die Probe 2 Strahlung der Wellenlänge 725 nm. Ab Z = - 2,0 h wurden beide Proben wieder dunkel gehalten. Eine dritte Probe (= 3) ist von Z = - 2,75...- 2,25 h mit Mischlicht bestrahlt worden. Z. Zt. Z = - 0,5 h wurden die Test-♀ eingekippt; fixiert wurde um Z = + 0,5 h.

b) Ergebnisse

In Tab. 10 sind die Ergebnisse einiger repräsentativer Versuche angegeben. Daß der Gametentiter nach alleiniger Bestrahlung mit Dunkelrot nicht mitbestimmt wurde, ist dadurch bedingt, daß nur drei Strahlengänge zur Verfügung standen. Es ist aber wichtiger zu sehen, daß die Wirkung, die sich manifestiert von der zeitlichen Anordnung von Hellrot und Dunkelrot zueinander abhängt. Außerdem wird bei Vergleich der Folge Hellrot-Dunkelrot mit der Folge Dunkelrot-Hellrot auch der Effekt eliminiert, der eventuell durch einen über sexuelle Aktivierung erfolgten Vorstufenverbrauch zustande ge-

kommen ist. Man sieht, daß eine Bestrahlung mit Wellenlängen von 589...647 nm unmittelbar nach einer durch 725 nm induzierten Repression des Gametentiters stets die Repression zum Teil wieder aufhebt. Warum unter diesen Bedingungen nicht der Ausgangszustand, d. h. der ursprüngliche Dunkelgametentiter wieder erreicht wird, kann mehrere Gründe haben: Vielleicht ist die angewendete Hellrotenergie zu niedrig. Zum Teil ist die schlechte Reversibilisierung sicher dadurch bedingt, daß sich die Absorptionskurven des Hellrot- und des Dunkelrotpigments in dem hier verwendeten Spektralbereich überschneiden. Es muß noch geprüft werden, ob durch den Bereich von 660...680 nm, in dem nach den bisherigen Erfahrungen (s. MOHR[99] und BUTLER et al.[24]) das Absorptionsmaximum der Hellrot absorbierenden Form des Pigments (= P_{HR}) liegt, eine bessere Reversibilisierung der durch Dunkelrot induzierten Hemmungen zu erzielen ist. Eine weitere Möglichkeit für die schlechte Reversibilisierung wäre, daß sich während der halbstündigen Dunkelrotbestrahlung ein Teil der induzierten Hemmung bereits irreversibel manifestiert hat. Die Entscheidung darüber, ob diese dritte Möglichkeit zutrifft oder nicht, kann - unabhängig von den beiden ersten - an Hand von Versuchen gefällt werden, bei denen Hellrot und Dunkelrot gleichzeitig eingestrahlt wird. Da Hellrot allein gegeben, nie eine Förderung geliefert hat, sondern im Gegenteil, wie das Störlichtwirkungsspektrum (Abb. 46) zeigt, geringe Hemmungen induziert, kann Hellrot bestenfalls reversibilisierende Wirkung haben. Versuche, bei denen eine durch Dunkelrot induzierte Hemmung durch gleichzeitiges Einstrahlen von Hellrot also sofort wieder - der Wirkungsstärke des Hellrot entsprechend - annulliert wurde, lieferten durchweg die gleichen Paarungsraten wie die Versuche, bei denen Hellrot nach Dunkelrot eingestrahlt wurde (s. Tab. 10). Das zeigt, daß sich während der halbstündigen Dunkelrotbestrahlung noch keine irreversible Hemmung der Kopulationsbereitschaft manifestiert hat.

In Tab. 10 ist noch ein Versuch angegeben, bei dem unter gleichen Bedingungen der Einfluß von blauer Strahlung (461 nm) in Kombination mit Dunkelrot geprüft wurde. Erwartungsgemäß erhält

man für die Kombination 30 min 725 nm/30 min 461 nm die gleiche Hemmung wie für 30 min 461 nm/30 min 725 nm. Das Licht der Wellenlänge 461 nm kann also eine durch Dunkelrot induzierte Hemmung nicht oder nur sehr schlecht reversibilisieren. Auf Grund des Wirkungsspektrums für die Hemmung durch Störlicht (Abb. 46) wird man sogar annehmen, daß Blau und Dunkelrot synergistisch gewirkt haben. Dies kann an Hand des Experimentes, bei dem Blau und Dunkelrot gleichzeitig eingestrahlt wurde, bestätigt werden. Die Programme 725 nm/461 nm und 461 nm/725 nm haben eine Hemmung geliefert, die durch $c - c_d = - 1{,}33$ a charakterisiert ist. Wenn Strahlung der Wellenlänge 461 nm etwa gleich stark hemmt wie Strahlung der Wellenlänge 725 nm, so muß man - da für eine durch Dunkelrot erzielte Hemmung Dosis-Wirkungs-Proportionalität besteht, sofern die Dosis durch Variation der Zeit variiert wird (s. XIII 3 a) - erwarten, daß nach Einstrahlung von Blau oder Dunkelrot alleine ein Konzentrationsunterschied von $c - c_d = - 0{,}67$ a erschienen wäre. Bei gleichzeitiger Einstrahlung von Blau und Dunkelrot wird nun in gleicher Zeit der doppelte Quantenstrom eingestrahlt. Die Wirkung ist aber dem Logarithmus des Quantenstromes proportional. Man müßte daher - auf Grund der Steigung der Dosis-Effekt-Kurve für Dunkelrot in Abb. 45 - für das Programm 461 nm + 725 nm eine Hemmung von $c - c_d = - 0{,}79$ a erwarten. Das Experiment hat einen Wert von $c - c_d = - 0{,}73$ a ergeben. Die Übereinstimmung mit dem theoretisch zu erwartenden Wert ist also überraschend gut. Die geringe Diskrepanz liegt so, wie sie bei geringerer Wirkungsstärke der Wellenlänge 461 nm - in Übereinstimmung mit dem Wirkungsspektrum der Abb. 46 - zu erwarten ist. Die synergistische Wirkung von blauer und dunkelroter Strahlung ist demnach gesichert.

Für die Bestimmung des Wirkungsspektrums der Reversibilisierung einer durch Dunkelrot gesetzten Repression sind kinetische Vorstudien erforderlich, für die die Dreistrahlapparatur nicht ausreicht. Man kann aber auf Grund der bisher vorliegenden Experimente für einige Wellenlängen eine Abschätzung der reversibilisierenden Wirkung angeben, indem man den Reversibilisierungsgrad R_λ bestimmt nach:

$$R_\lambda = \frac{\text{Probit } G_{725/\lambda}/G_p - \text{Probit } G_{\lambda/725}/G_p}{\text{Probit } G_d / G_p - \text{Probit } G_{\lambda/725}/G_p} \quad (53)$$

Hiernach ergeben sich die in Tab. 11 aufgeführten Werte. Sie sprechen für P_{HR} als wirksamen Photorezeptor.

Nach den vorstehenden Untersuchungen kann kein Zweifel darüber bestehen, daß das bekannte Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem oder Phytochrom als photomorphogenetischer Regulator in die sexuelle Aktivierung von Chlamydomonas eingreift.

XIV. Die Hochenergiereaktion und das Adaptationsvermögen

Betrachtet man noch einmal die Abb. 45, so fällt bei der Kurve, die den Einfluß von Störlicht der Wellenlänge 745 nm für B = - 3,0 h wiedergibt auf, daß der Meßpunkt bei $\bar{N}$ = 5,2 mm^3 Quanten/min von dem durch die Meßpunkte bei kleineren Quantenströmen festgelegten Kurvenverlauf signifikant abweicht. Diese Abweichung scheint ein Hinweis dafür zu sein, daß außer dem hemmenden Einfluß von dunkelroter Strahlung noch eine gegenläufige Wirkung besteht, die erst bei Einstrahlung relativ hoher Energie registrierbar wird. Um den Nachweis dieser antagonistischen Reaktion an ♀ zu erbringen (vgl. Abb. 48), wurde einmal die Energie dadurch erhöht, daß von B = - 4,0 h ab exponiert wurde bis zum Zeitpunkt der Fixierung F = + 1,0 h. Die Test-♀ wurden wie oben um M = - 1,0 h eingekippt. Außerdem wurde neben der Filterkombination für 745 nm (1 IL + 2 mm RG 9) ein Glasfilter vom Typ RG 9 (2 mm) allein verwendet. Dieses läßt nur Wellenlängen $>$ 700 nm durch. Wegen des großen durch die Apparatur bedingten Wasserweges von 35 cm (s. Abb. 37) erhält man damit ein Spektralband, das praktisch nur Strahlung zwischen 700 und 800 nm Wellenlänge enthält. Auf diese Weise konnten im dunkelroten Bereich des Spektrums Quantenströme bis $\bar{N}$ = 30 mm^3 Quanten/min erhalten werden.

Man findet für 744 und 745 nm bei Quantenströmen $\bar{N} \leq 1$ mm^3 Quanten/min eine mit dem Logarithmus der Quantenströme ansteigende Hemmung.(s. Abb. 48). Die größte Hemmung wird bei $\bar{N} \approx 1$ mm^3

Quanten/min erreicht. Bei weiterem Anstieg von $\bar{N}$ verschwindet die Hemmung wieder, wobei man auch ein dem Logarithmus der Intensität proportionales Ansteigen annehmen darf. Im Vergleich zu der bei B = - 3,0 h und t = 30 min gefundenen Abhängigkeit sei bemerkt, daß beide Kurvenäste in ihrem abfallenden Teil gut parallel laufen, daß aber die bei 10-facher Expositionsdauer gewonnene Kurve erwartungsgemäß etwas tiefer liegt und dementsprechend der Wiederanstieg früher erfolgt.

Die nach Einstrahlung geringer Energiemengen bei 745 nm auftretende Hemmung ist, wie in XIII gezeigt wurde , auf das reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem, eine Niederenergiereaktion (= NER), zurückzuführen. Den bei der gleichen Wellenlänge bei Einstrahlung großer Energiemengen beobachteten Wiederanstieg kann man durch zusätzliche Annahme eines weiteren Reaktionssystems erklären, welches neben dem reversiblen Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem bei Einstrahlung großer Energiemengen in Aktion tritt. Es ist sehr wahrscheinlich, daß es sich hier um eine Wirkung der weit verbreiteten sogenannten "Hochenergiereaktion" (= HER) oder des "Blau-Dunkelrot-Reaktionssystems" handelt (vgl. hierzu MOHR[99] und MOHR et al.[104]).

Nach den Untersuchungen von MOHR[98] an Sinapis alba hat das Wirkungsspektrum der HER u. a. einen starken steilen Gipfel im Dunkelrot zwischen 720 und 730 nm; die Wirkung bei 745 nm beträgt nur noch rund 1/5 davon. Dagegen ist die Absorption von P_{DR} im Bereich von 710 bis 750 nm etwa gleich gut. Falls bei Chlamydomonas ähnliche Verhältnisse vorliegen, sollte man erwarten, daß die HER, die sich bei Anregung mit den Wellenlängen 744 bzw. 745 nm in ihrem Einfluß auf die sexuelle Aktivität nur schlecht gegen die NER durchsetzen kann (s. Abb. 47). sich gegenüber der antagonistischen Wirkung der NER besser behauptet, wenn man unter sonst gleichen Bedingungen mit dem Spektralbereich von 700... 800 nm bestrahlt. Das Ergebnis (s. Abb. 48) entspricht der Erwartung. Es ist somit gezeigt, daß die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas unter Hochenergiebedingungen auch über das Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem beeinflußt werden kann.

Ursprünglich hatten SIEGELMANN et al.[125,126,127] und MOHR[97] auf Grund der ausgearbeiteten Wirkungsspektren vermutet, daß die Wirkung der HER durch Strahlungsabsorption in einem kupferhaltigen Flavoproteid, etwa der Butyryl-Coenzym A-Dehydrase, zustande kommt. Es wurde also an eine direkte Enzymaktivierung gedacht. Diese Auffassung wird neuerdings durch die Untersuchungen von KANDELER[69] gestützt, der an Rotkohlkeimlingen zeigen konnte, daß bei der durch die HER aktivierten Anthocyansynthese die Primärwirkung der HER in der Beschleunigung des Fettabbaues zu suchen ist und zwar in einer Aktivierung der Acetyl-Coenzym A-Dehydrase. Dadurch und auch auf Grund der Ergebnisse und Betrachtungen von MOHR et al.[101,104] hat die kürzlich von HENDRICKS et al.[58,59,60] vorgeschlagene Deutung - wonach die HER als Folge gleichzeitiger Anregung von P_{DR} und P_{HR} erklärt wird - an Gewicht verloren.

In Abb. 48 sind noch zwei Versuche mit λ = 589 nm angegeben, die am gleichen Material durchgeführt sind. In einem Falle wurde ab B = - 4,0 h, im anderen ab B = + 8,0 h für t = 300 min bestrahlt. Die Paarungsrate wurde erfaßt bei M = - 1,0 h und F = + 1,0 h. Z. Zt. des erwarteten Tagbeginns ist unabhängig von der eingestrahlten Energie gelben Lichtes nach langen Expositionszeiten keine wesentliche Verbesserung der sexuellen Aktivität zu erkennen (s. Abb. 48), obwohl man nach kurzzeitiger Bestrahlung mit gelbem Licht einen starken Aktivierungseffekt erhält (s. Abb. 40). Wie bereits aus Abb. 40 b zu entnehmen, klingt die Aktivitätssteigerung in den Morgenstunden aber bald wieder ab, um unter Umständen sogar einer Depression Platz zu machen. Dieses dynamische Verhalten spricht für die Fähigkeit zur Adaptation in ähnlicher Weise, wie sie etwa bei der Lichtwachstumsreaktion von Phycomyces verwirklicht ist (s. REICHARDT[116]). Erschwerend ist jedoch, daß in den Abendstunden bei gleich langer Dauer der Vorbestrahlung ein extremer Anstieg des Gametentiters mit anwachsenden Quantenströmen $\bar{N}$ in Erscheinung tritt (s. Abb. 48). Da C. moewusii und C. eugametos obligat photoautotroph sind (s. II 1), kann im DD keine konstante Nahrungszufuhr garantiert werden. Es erscheint daher wenig aussichtsreich, durch adaptations-

kinetische Studien Hinweise für den verantwortlichen Regulationsmechanismus zu erhalten.

XV. Die Interpretation der tagesperiodischen Änderungen des Wirkungsspektrums der sexuellen Aktivierung

Durch die Untersuchungen in XIII ist gezeigt worden, daß die Gametogenese von C. moewusii ⊖ über das reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem beeinflußt werden kann. Damit bei ⊖-Kulturen, die im 14 h:10 h L:D-Wechsel angezogen sind, z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns optimale sexuelle Aktivität erscheint, ist es offenbar notwendig, daß das Phytochrom 2...3 h vorher, d. h. in der zweiten Nachthälfte, als P_{DR} vorliegt. Bestrahlung mit Dunkelrot in diesem Zeitbereich führt dementsprechend zu einer Hemmung der Gametogenese, die durch anschließende Bestrahlung mit Hellrot wieder weitgehend aufgehoben werden kann. Zu anderen Tageszeiten läßt sich durch Dunkelrot praktisch keine Hemmung erzielen, im Gegenteil: Eine Bestrahlung mit Dunkelrot in den ersten Nachtstunden zieht sogar eine Förderung der sexuellen Aktivität z. Zt. des erwarteten Tagbeginns nach sich. Es ist auch möglich, durch Bestrahlung mit Dunkelrot in der zweiten Nachthälfte eine Verbesserung der sexuellen Aktivität z. Zt. des Tagbeginns zu erhalten. Dieser Effekt tritt jedoch nur auf , wenn extrem kleine oder große Energien eingestrahlt worden sind. Während die Förderung durch große Energien offenbar über Strahlungsabsorption im Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem (HFR) ausgelöst wird (s. XIV), hat der fördernde Einfluß der extrem kleinen Energien scheinbar etwas mit einem Phasenverschiebungseffekt (s. XIII 2) zu tun. Beide Effekte sind noch nicht eingehend analysiert worden, denn es ist ausgeschlossen, daß sie sich unter den Bedingungen, unter denen die Wirkungsspektren der sexuellen Aktivierung (s. XII 5) bestimmt worden sind, auf diese ausgewirkt haben. Für die Unterschiede im Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung (s. Abb. 41) scheinen vor allem die Empfindlichkeitsschwankungen bezüglich des Phytochroms von Bedeutung zu sein. Wenn diese

mit der endogenen Tagesrhythmik zusammenhängen, d. h. tagesperiodisch erfolgen, so sollte man erwarten, daß neben dem Bereich maximaler Empfindlichkeit für eine Hemmung der Gametogenese durch Dunkelrot, ein Bereich maximaler Empfindlichkeit für eine Aktivierung der Gametogenese durch Hellrot besteht. Nachdem der Bereich maximaler Hemmung durch Dunkelrot in die letzten Nachtstunden fällt, wird man den Bereich maximaler Förderung durch Hellrot gegen Tagende erwarten. Unter diesem Gesichtspunkt müßte der Hellrot-Gipfel (627 nm) des um Z = + 13 h aufgenommenen Wirkungsspektrums (s. Abb. 41 a) bzw. des Differenzspektrums (s. Abb. 41 b) auf Strahlungsabsorption in P_{HR} zurückzuführen sein. Hierfür spricht besonders die Tatsache, daß ♀, die durch dunkelrotes Störlicht in der zweiten Nachthälfte nur wenig gehemmt werden (s. XIII 4), auch um Z = + 13 h durch Hellrot nur wenig gefördert werden (Tab. 9). Unter den gegebenen Umständen kann also die sexuelle Aktivität von ♀ im Gegensatz zu ♂ über das Phytochrom nur wenig beeinflußt werden. Daß der Hellrot-Gipfel in dem an ♂ z. Zt. des Aktivitätsminimums aufgenommenen Wirkungsspektrum zu kürzeren Wellenlängen verschoben ist, spricht dafür, daß die sexuelle Aktivität von ♂ zu dieser Zeit allein durch Umwandlung von P_{HR} in P_{DR} nicht wesentlich verbessert werden kann. Nur wenn das Blau-Gelb-Pigment mit angeregt wird, kann sich die erhöhte Konzentration von P_{DR} offenbar in einer Aktivitätssteigerung auswirken. Im Gegensatz hierzu wird durch alleinige Anregung des Blau-Gelb-Pigments stets eine Verbesserung der sexuellen Aktivität erzielt. Dadurch wird wahrscheinlich, daß in der Synthesekette der Wirkungsort des Blau-Gelb-Pigments hinter dem des Phytochroms liegt. Ein Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme könnte erbracht werden, wenn man zu der fraglichen Zeit das Material mit Strahlung der Wellenlängen 583 oder 461 nm aktiviert und zusätzlich Strahlung aus verschiedenen Bezirken des hellroten Spektralbereiches (620...680 nm) einstrahlt. Bei gleichzeitiger Einstrahlung gleicher Quantenströme bei zwei verschiedenen Wellenlängen, die über das gleiche Pigment gleichsinnig wirken, muß man erwarten, daß sich der erzielte Konzentrationsunterschied von X aus den Einzelef-

fekten zusammensetzt nach:

$$c - c_d = |\text{Probit } G_{\lambda_{1,2}}/G_p - \text{Probit } G_d/G_p| \cdot a =$$
$$|\text{Probit } G_{\lambda_1}/G_p - \text{Probit } G_{\lambda_2}/G_p| \cdot a +$$
$$n \cdot |\text{Probit } G_{\lambda_2}/G_p - \text{Probit } G_d/G_p| \cdot a \qquad (54)$$

wobei $|\text{Probit } G_{\lambda_1}/G_p| > |\text{Probit } G_{\lambda_2}/G_p|$. n gibt an, der wievielfache Konzentrationsunterschied von X bei Quantenstromverdoppelung auftritt und kann den Dosis-Effekt-Kurven (Abb. 40) entnommen werden. Wirkt nun gelbe und hellrote Strahlung z. Zt. Z = + 12,0...+ 14,0 h jeweils über das Blau-Gelb-Pigment und das Hellrotpigment an zwei verschiedenen Stellen der Synthesekette fördernd, so müßte bei gleichzeitiger Einstrahlung von Gelb und Hellrot ein größerer Konzentrationsunterschied an X auftreten als der nach Gleichung (54) aus den Einzelwirkunge errechnete. Die experimentelle Bestätigung hierfür steht noch aus, da die in der Doppelstrahlapparatur (Abb. 47) zur Verfügung stehende Energie aus lampentechnischen Gründen vorerst zu gering war und unter diesen Umständen eine ausreichende Aktivierung der Zellen z. Zt. des Dunkelgametenminimums nicht gelang.

Für den Fall gleichzeitiger Einstrahlung von Quanten zweier Wellenlängen, die über zwei antagonistisch wirkende Pigmente unabhängig voneinander einen Einfluß auf die sexuelle Aktivität ausüben, läßt sich die erhaltene Endkonzentration von X angeben als:

$$c = \text{Probit } G_{\lambda_{1,2}}/G_p = \text{Probit } G_{\lambda_1}/G_p +$$
$$\text{Probit } G_{\lambda_2}/G_p - \text{Probit } G_d/G_p \qquad (55)$$

Zwei Versuche an ♀ bei B = + 12,5 h, t = 30 min, M = + 13,0 h und F = + 14,0 h mit dem erreichbaren Quantenstrom $\bar{N}$ = 0,149 mm^3 Quanten/min sollten wenigstens zeigen, ob z. Zt. des diurnalen Aktivitätsminimums eine durch Gelb oder Blau induzierte Aktivitätssteigerung durch gleichzeitiges Einstrahlen von Dun

kelrot reprimiert wird. Das Ergebnis ist in Tab. 12 angegeben. Trotz der schlechten Aktivierung kann man folgern, daß z. Zt. des Gametenminimums der hemmende Einfluß von Dunkelrot sehr gering ist.

Zur Zeit des Dunkelgametenmaximums, genauer im Zeitraum Z = 0 h...+ 3 h, dagegen reichten die zur Verfügung stehenden Quantenströme zur Bearbeitung der entsprechenden Fragestellungen aus. Drei Experimente dieser Art, die bei B = + 1,5 h, t = 30 min, M = + 2,0 h und F = + 3,0 h mit $\bar{N}$ = 0,149 mm^3 Quanten/min an ♀ durchgeführt wurden, lieferten die in Tab. 13 angegebenen Werte. Die für die Doppelbestrahlung theoretisch zu erwartenden Paarungsraten sind nach Gleichung (54) bzw. (55) berechnet und stimmen mit den experimentell gefundenen Werten überraschend gut überein. Es ist daher als sicher zu betrachten, daß die sexuelle Aktivierung durch blaues und gelbes Licht über den gleichen Mechanismus erfolgt; ebenso die schwache Förderung durch Hellrot im Bereich des Tagbeginns. Die geringe Hemmung, die zur gleichen Zeit durch Dunkelrot erzielt wird, prägt sich aber gegen die Gelb-Förderung in voller Größe aus. Diese beiden Lichtwirkungen manifestieren sich also erwartungsgemäß unabhängig voneinander. Davon unabhängig fällt auf, daß die Zellen bei B = + 1,5 h durch λ = 461 nm wesentlich besser aktiviert werden als durch λ = 589 nm. Die Wirkungsstärke von λ = 461 nm ist - in Übereinstimmung mit den Verhältnissen um Z = + 13 h und entgegengesetzt denen um Z = 0 h - also bereits wieder ein mehrfaches der Wirkungsstärke von λ = 589 nm.

Nachdem der Hellrot-Gipfel des Differenzspektrums (Abb. 41 b) durch eine über Strahlungsabsorption in P_{HR} induzierte Aktivitätssteigerung bedingt ist, liegt es nahe, den Blau-Gipfel als Folge der antagonistischen Reaktion zu erklären. Auf Grund des Wirkungsspektrums für die Hemmung der sexuellen Aktivität durch Störlicht (Abb. 46) und durch die Versuche aus XIII 5 (Tab.10) ist bereits gesichert, daß blaue Strahlung tatsächlich ähnlich wie Dunkelrot bei ♀ starke Hemmungen der Gametogenese induzieren kann. Berücksichtigt man ferner, daß z. Zt. des Dunkelgametenmaximums bei Bestrahlung mit blauem Licht nach

kurzzeitiger starker Aktivierung der Gametentiter zusammenbricht (s. Abb. 40 b), so kann man die Schwankungen im blauen Spektralbereich weitgehend erklären, wenn man die in XI 7 gegebene Hypothese als Interpretationsbasis heranzieht. Diese Hypothese kann auf Grund der Versuche aus XII...XIV verfeinert werden. Es hat sich nämlich gezeigt, daß es in der ersten Nachthälfte weder durch Anregung des Blau-Gelb-Pigments noch von P_{DR} möglich ist, die Vorstufe V zu verbrauchen, die zur Synthese der sexuellen Affinität z. Zt. des erwarteten Tagbeginns benötigt wird. V muß also unter dem regulativen Einfluß der endogenen Tagesrhythmik in der zweiten Nachthälfte gebildet werden. Durch Strahlungsabsorption in P_{DR}, d. h. durch Bildung von P_{HR} während der zweiten Nachthälfte scheint es möglich, die Anhäufung von V zu drosseln. V wird zur Synthese von X in den letzten Nacht- und ersten Tagstunden weitgehend aufgebraucht. Durch eine Anregung von P_{HR}, d. h. durch Bildung von P_{DR} kann jedoch auch in den nachfolgenden Abendstunden eine begrenzte Bildung von V erzielt werden, die bei gleichzeitiger Anregung des Blau-Gelb-Pigments zur Synthese der sexuellen Affinität ausreicht. Es ist daher gerechtfertigt, das Syntheseschema der Gleichung (19') abzuändern zu:

$$Y \ldots \underset{P_{HR}}{\overset{P_{DR}}{\rightleftarrows}} \ldots V \ldots \xrightarrow{P_{BG}} \ldots X \ldots \xrightarrow{k} A. \qquad (19'')$$

Das bedeutet, daß unabhängig von den endodiurnal gesteuerten tagesperiodisch antagonistischen Schwankungen der Durchflußgrößen zwischen Y und V, und V und X, diese auch durch Strahlungsabsorption im Phytochrom bzw. im Blau-Gelb-Pigment (= P_{BG}) beeinflußt werden können. Dieses Schema steht nicht im Widerspruch dazu, daß die Synthese der sexuellen Affinität nach einem Reaktionsmechanismus 2. Ordnung erfolgt (s. XII 4 a). Denn diese Bedingung ist sofort erfüllt, wenn am Aufbau von X oder V außer V oder Y noch eine weitere in begrenzter Konzentration vorliegende Komponente beteiligt ist. Auch das Verhalten der ♀ kann durch dieses Schema erklärt werden. Die Annahme, daß die Tendenz zur Bildung von V bei ♀ etwas größer ist als bei ♀, könnte z. B. ohne weiteres die weitgehende Unabhängigkeit der

vom Phytochrom erklären. Aus dem Schema (19'') ergibt sich nun für ♀, daß bei Bestrahlung mit blauem Licht in den ersten Morgenstunden, d. h. bei bereits weitgehend abgebautem Pool von V nur kurzzeitig eine Anhäufung von X auftreten kann, da das geringe Pool an V beschleunigt sowohl in Richtung X wie auch in Richtung Y umgesetzt wird und die Konzentrationserhöhung von X wegen der Rückreaktion (= Abbau zu A) rasch wieder verschwindet. Unter diesen Umständen wäre es denkbar, daß selbst bei Einmischen der Test-♀ vor Belichtungsbeginn nur ein geringer Bruchteil der aktivitätssteigernden Wirkung von Blaulicht im Paarungstest erfaßt wird, weil bei einem Teil der ♀-Zellen die sexuelle Affinität verschwindet, ehe die Plasmabrücke zwischen den Reaktionspartnern gebildet ist.

Unter Berücksichtigung des eben gesagten darf man den um Z = + 13 h gemessenen hohen Blaugipfel bei 461 nm und den um Z = 0 h gemessenen etwa halb so hohen Gelb-Gipfel bei 583 nm (s. Abb. 41 a) als zum gleichen Pigment gehörig betrachten. Es ist demnach charakterisiert durch eine scharfe Bande bei 460 (...450) nm und eine etwa halb so hohe bei 580 nm. Bei 510 nm liegt ein Wirkungsminimum, desgleichen ist die Wirkung im Bereich 620...800 nm sehr gering. Wenn man die Ergebnisse von FÖRSTER[37,38] und die von XII 2 (Abb. 36) mit berücksichtigt, so kommt man zu dem Schluß, daß bei allen 4 Klonen das Blau-Gelb-Pigment eine Schlüsselrolle bei der sexuellen Aktivierung durch sichtbare Strahlung zukommt. Das Wirkungsspektrum des unverfälschten Blau-Gelb-Pigments ist in Abb. 49 so dargestellt, daß $W_{461} = 1$ gesetzt wurde. Zum Vergleich wurde das Absorptionsspektrum einer ♀-Suspension mit Hilfe der ULBRICHT'schen Kugel aufgenommen und so das Absorptionsspektrum der Summe aller Chlamydomonaspigmente erhalten. Das Absorptionsspektrum ist nach der gleichen Methode, wie sie WARBURG et al.[152] verwendet haben, bestimmt worden. Ist bei der Messung mit der ULBRICHT'schen Kugel I_o die in die Zellsuspension eingestrahlte und I die austretende Licht-Intensität, so gilt das BEER-LAMBERT'sche Gesetz:

$$I = I_o \cdot e^{-b \cdot x} \qquad (56)$$

wobei b der Absorptionskoeffizient und x die optische Weglänge

sind. Variiert man die Wellenlänge und läßt das Volumen der Zellsuspension und die Zelldichte konstant, so gilt, da der Durchlaß $d = I/I_0$:

$$\frac{\ln (I/I_0)_1}{\ln (I/I_0)_2} = \frac{\log d_1}{\log d_2} = \frac{b_1 \cdot x_1}{b_2 \cdot x_2} \qquad (57)$$

Wegen der Änderung der Streuung mit der Wellenlänge ist in Zellsuspensionen $x_1 \neq x_2$. Die Lichtstreuung durch pigmenthaltige Pflanzenzellen ist selektiv (LATIMER et al.[79]) und folgt nicht dem Streuungsgesetz ($S \sim \lambda^{-4}$). Die ermittelte Absorptionskurve weicht also wegen der Zerstreuung in unbekannter Weise von der wahren Absorptionskurve der Pigmente ab. Mann kann diesen Fehler klein halten, wenn man mit kleinen Zelldichten arbeitet. Das Absorptionsspektrum ist deshalb bei der geringen Flächenbelegung von $0{,}35 \cdot 10^{-3}$ cm^3 Zellen/cm^2 aufgenommen worden. Das in Abb. 49 angegebene Absorptionsspektrum ist aus 6 Meßserien berechnet. Wie man aus Abb. 49 sieht, hat das Absorptionsspektrum von Φ eine andere Form als das Wirkungsspektrum des Blau-Gelb-Pigments. Man muß deshalb mit einer durch Schirmpigmente (Chlorophyll, Karotin, Xantophyll) bedingten Verzerrung des Wirkungsspektrums rechnen. Wegen des steilen Anstiegs der Zellabsorption im blauen Bereich darf man das Absorptionsmaximum des Blau-Gelb-Pigments hier eher etwas kurzwelliger im Bereich von 440...460 nm vermuten; außerdem erscheint der Blau-Gipfel des Wirkungsspektrums gegenüber dem Gelb-Gipfel sicher etwas zu niedrig. Der Unterschied dürfte jedoch, wie in XII 1 begründet, nur wenige Prozente betragen. Der Gelb-Gipfel selbst liegt gerade in dem Bereich, in dem die Zellen nur schwach absorbieren; hier ist demnach geringe Verzerrung zu erwarten. Der Gelb-Gipfel des absorbierenden Pigments dürfte also in dem Bereich von 580...590 nm liegen. So betrachtet, erinnert das Wirkungsspektrum in seiner Form an einen absorbierenden Stoff von der Klasse der Schwermetallporphyrine (HARTMANN[50]), eine Ansicht, die auch von MOHR[100] - bereits auf Grund des von FÖRSTER[37] an C. eugametos ausgearbeiteten Wirkungsspektrums - geäußert wurde. Die Funktion solcher Substanzen als prosthetische Gruppen in den Cytochromen ist bekannt. Die beste Übereinstim-

mung zeigt das Wirkungsspektrum in dieser Hinsicht mit den Absorptionsspektren der reduzierten Cytochrome der a-Gruppe deren α-Banden bei 600 nm und deren γ-Banden bei 450 nm liegen (vgl. hierzu JAMES et al.[66]). Es liegt daher nahe zu prüfen, ob generell durch Regulierung der Atmungsgröße eine Regulierung der sexuellen Aktivität von Chlamydomonas möglich ist. Die Mitteilung von STIFTER[130], daß die Gamonsynthese bei σ nur bei Anwesenheit von Sauerstoff abläuft, sowie ein Hinweis bei LEWIN[87], wonach durch Licht sexuell aktivierte ♀-Zellen ihre Aktivität im Dunkeln schneller verlieren, wenn man ihnen den Sauerstoff entzieht, ließen solche Versuche von vornherein sehr erfolgversprechend erscheinen.

XVI. Sauerstoffpartialdruck und sexuelle Aktivität

1. Versuche mit dem Agglutinationstest

a) Methodik

Eine aus Plexiglas und Vinidur gefertigte Gaskammer mit einem Durchmesser von 6,5 cm und einer Höhe von 1,5 cm ermöglichte die Durchführung des Agglutinationstestes (s. III 3) unter definierten atmosphärischen Bedingungen. Proben der Zellsuspensionen konnten auf Objektträgern getrennt in die Gaskammer eingebracht und zur gewünschten Zeit - nach Einstellen der Atmosphäre - gemischt werden. Um störende Einflüsse durch Photosynthese zu verhindern, sind die Versuche im Bereich Z = - 2...+ 1 h an Dunkelgameten durchgeführt worden. Zur Beobachtung des Reaktionsablaufs bei den Gaskammerversuchen wurde jeweils im Abstand von einigen Minuten nur für etwa 5 sec die Beleuchtung ($\approx$ 100 Lux) eingeschaltet.

Da Sauerstoff und Stickstoff in Stahlflaschen Spuren von Stickoxyden bilden können, die für Zellen giftig sind (WARBURG[146]), wurde als inertes Gas an Stelle von Stickstoff nur Argon (99,99 %) verwendet. Dieses wurde, um Reste von Sauerstoff zu entfernen, mittels kleiner Fritten durch alkalische Pyrogallollösung geperlt.

b) Ergebnisse

Bringt man Proben einer ♀-Suspension (G_d/G_p = 40...60 %) und einer ♀-Suspension (G_d/G_p > 70 %) in die Gaskammer und beginnt unmittelbar nach dem Mischen der Geschlechter mit dem Durchleiten von sauerstofffreiem Argon (≈4 l), so entspricht die Stärke der Gruppenbildung und die Beweglichkeit der Zellen in den ersten 2...3 min ganz denen der Luftkontrolle. Bereits 5 min nach dem Einleiten des Argons ist die Agglutination gegenüber der Luftkontrolle jedoch deutlich schwächer. Auch die Beweglichkeit der Zellen nimmt etwas ab; ein geringer Prozentsatz der ♀-Zellen (< 10 %) wird sogar unbeweglich. Die Bewegung der Geißeln sistiert zwar nicht vollkommen, aber die Zellen haften in der Flüssigkeitsoberfläche oder am Glas. Während in der Luftkontrolle bereits 20 min nach dem Mischen die ersten Pärchen auftreten und nach 1 h neben einer großen Zahl von Pärchen noch zahlreiche Agglutinate vorhanden sind, ist die Gruppenbildung in Argon im Verlauf von 20...30 min praktisch völlig abgeklungen und es haben sich nur ganz vereinzelte Pärchen gebildet. Dieses Verhalten beobachtet man am häufigsten; es gibt aber Abweichungen. Bei weniger gut aktiven ♀-Kulturen (G_d/G_p < 30 %) klingt die Agglutination in Argon schneller ab; bereits nach < 15 min ist die Fähigkeit zur Dunkelagglutination in Argon verschwunden. Andererseits läuft bei ♀-Kulturen mit einem Dunkelgametentiter G_d/G_p > 80 % und entsprechend gut aktiven ♀ selbst nach 2-stündigem Aufenthalt in Argon noch schwache Gruppenbildung ab; auch Pärchenbildung kann man bei solchem Material nach diesem Zeitraum noch beobachten. Auf jeden Fall sind die Zellen aber in ihrer sexuellen Aktivität ana stark gehemmt.

Mischt man die Geschlechter erst 15 min nach dem Angleichen an die Argonatmosphäre, so treten bei Verwendung von ♀-Kulturen mit einem Dunkelgametentiter $G_d/G_p \approx 50$ % für 5...10 min noch ganz vereinzelte "Grüppchen" (es agglutinieren weniger als 10 Zellen) aber keine Pärchen mehr auf. Mischt man die Geschlechter erst 25 min nach dem Durchleiten des Argons, so bilden sic

keine Agglutinationsansätze und keine Pärchen mehr. Überführt man ein solches Gemisch nach einem 0,5...3-stündigen Aufenthalt in der Argonatmosphäre wieder in Luft, so setzt nach < 5 min Gruppenbildung ein und die Paarung läuft normal ab, die sexuelle Aktivität bleibt aber schwächer als die der Luftkontrollen und zwar um so schwächer, je länger die Zellen in Argon waren. Die Hemmung der Kopulation durch kurzzeitigen Entzug des Sauerstoffs erscheint voll reversibel; nach längerem Sauerstoffentzug ist die Kopulationshemmung aber nur noch teilweise reversibel. Eine mögliche Erklärung hierfür wird weiter unten (XX 2 b) diskutiert.

Aus den bisherigen Versuchen läßt sich nicht entscheiden, ob es die Gamonsynthese oder die Agglutinationsreaktion ist, die bei Entzug des Sauerstoffs gehemmt wird. Eine gewisse Aussage hierüber liefern Versuche der folgenden Art: Hält man ♁- und ♀-Zellen 0,5...3 h getrennt in einer Argonatmosphare und mischt die Zellen unmittelbar nach Entnahme hieraus in Luft mit sexuell voll aktiven Zellen des anderen Geschlechts, so setzt die Gruppenbildung im Vergleich zu den Luftkontrollen bei ♁ meist verzögert ein. Es treten bei ♁-Kulturen mit $G_d/G_p < 30$ % Reaktionsverzögerungen bis zu 3 min auf. Anaerob gehaltene ♁-Kulturen mit $G_d/G_p > 80$ % dagegen liefern erwartungsgemäß unmittelbar nach dem Mischen mit voll aktiven ♀ bereits schwache Gruppenbildung. Die anaerob gehaltenen ♀ agglutinieren in der Regel mit voll aktiven ♁ sofort nach dem Mischen. Die Argon-♀ reagieren aber anfangs stets schlechter als die entsprechenden Luftkontrollen. Nach etwa 10 min ist die Agglutinationsreaktion bei den Argon-♁ bzw. -♀ wieder fast so stark wie bei den Luftkontrollen. Die Reaktionsfähigkeit der Zellen, die 3 h anaerob gehalten waren, bleibt aber deutlich hinter denen der Luftkontrollen zurück. Berücksichtigt man die Tatsache, daß bei Zugabe von isolierten Gamonen eines Geschlechts zu sexuell reaktionsfähigen Zellen des anderen Geschlechts sich sofort Gruppen bilden (FÖRSTER et al.[40]), so muß man aus dem Ergebnis der vorstehenden Versuche schließen, daß anaerob die Gamonsynthese - zumindest partiell - gehemmt ist, und zwar bei ♁ wie auch bei ♀. Die sexuelle Aktivität der ♀ ist jedoch unter anaeroben

wie unter aeroben Bedingungen stets besser als die von ♀. Unter diesen Umständen ist es gerechtfertigt, das beim Einbringen in Argon beobachtete Abklingen der Gruppenbildung als eine Folge der gehemmten Gamonsynthese anzusehen.

2. Versuche mit dem Paarungstest

a) Methodik

Die jetzt folgenden Versuche sind Versuche mit dem Paarungstest (s. III 5). Sie wurden unter den gleichen Bedingungen wie bisher (s. XII 3 h) in manometrischer Anordnung durchgeführt. Die Zellsuspension (♀, ♂), deren Gametentiter bestimmt werden sollte, war im Hauptraum, die mehrfache Menge an ♀-Zellen in der Birne. Um bei ♀ und ♂ die Abhängigkeit der Paarung vom Sauerstoffpartialdruck zu fassen, wurden die fertig beschickten Manometriegefäße zuerst mit 2...4 l Argon durchströmt dabei wurde mit einer Frequenz von $\nu = 4\ sec^{-1}$ geschüttelt. 20 min nach dem Einleiten des Argons - nach dieser Zeit ist die sexuelle Potenz der ♂ und ♀ praktisch verschwunden - wurden die ♀ aus der Birne eingekippt. Ein Gefäß blieb unter Argon, durch die übrigen wurden nach dem Einkippen der ♀ Gasgemische bekannter Zusammensetzung geleitet. Wie oben wurden pro Gefäß 2...4 l Gasgemisch bei einer Schüttelfrequenz von $\nu = 4\ sec^{-1}$ und einem Druck von 100...200 mm H_2O durchgeblasen. Nach Beendigung des Gaseinleitens (3...7 min) wurde die Schüttelfrequenz auf $\nu = 3\ sec^{-1}$ erniedrigt. Die Herstellung der Gasgemische erfolgte in "Gasmischaggregaten" (s. Abb. 50) mit 20 % Na_2SO_4 in 5 % H_2SO_4 als Gassperrflüssigkeit (s. D'ANS et al.[27]). Unter Vorschaltung einer Waschflasche mit 33 %iger NaOH wurden die Gase (Sauerstoff, Argon) in den Mischraum gefüllt.

Als Bezugswert für die Auswertung diente die nach 60 min in einer Argonatmosphäre mit 20 Vol.-% Sauerstoff erhaltene Paarungsrate, d. h. der Konzentrationsunterschied des Kontrollsubstrates X wird angegeben als:

$$\Delta c = c^{x\ \%} - c^{20\ \%} = (\text{Probit } G_{y\ \text{min}}^{x\ \%\ O_2}/G_p - \text{Probit } G_{60\ \text{min}}^{20\ \%\ O_2}/G_p) \cdot a \qquad (59)$$

Auf diese Weise lassen sich alle Versuche unabhängig von den verschiedenen Bezugswerten gemeinsam auswerten.

b) Ergebnisse

In einigen Versuchen an ♀ mit 1 bzw. 20 Vol.-% Sauerstoff in Argon wurde zunächst festgestellt, nach welcher Zeitspanne sich die erreichbare Paarungsrate eingespielt hat. Hierzu waren die Versuche so angesetzt, daß um Z = - 2,0 h die definierten Gasgemische eingeleitet wurden. Fixiert wurde 15...180 min später, also spätestens um Z = + 1,0 h. G_p wurde unter Normalbedingungen bestimmt. Es sind auch zwei Versuche ab Z = + 12 h ($G_d/G_p \rightarrow 0$) an lichtinduzierten Gameten durchgeführt worden. Die Manometriegefäße waren dabei vom Zeitpunkt des Einleitens der sauerstoffhaltigen Gasgemische an mit 100 Lux (HNW) belichtet worden. Die Bezugswerte der Versuche um Z = - 2,0 h lagen im Bereich G_d/G_p = 5,1...61 %, bei den Versuchen um Z = + 12 h mit lichtinduzierten Gameten bei G_i/G_p = 52 bzw. 68 %. Diese Werte entsprechen zu 50...100 % den unter Normalbedingungen erhaltenen Paarungsraten. Hierin kommt zum Ausdruck, daß die Kopulationshemmung durch 20 min Anaerobiose im allgemeinen bereits nicht mehr voll reversibel ist (vgl. XVI 1 b). Die Ergebnisse aller Versuche sind in Abb. 51 graphisch dargestellt. Man sieht, daß 60 min nach dem Einleiten von Argon mit 1 oder 20 Vol. % Sauerstoff sich der erreichbare Gametentiter eingespielt hat. Außerdem - und dies ist besonders wichtig - zeigen die Versuche, daß in einer Atmosphäre, die nur 1 Vol. % Sauerstoff enthält, selbst bei stundenlangem Inkubieren die bei 20 Vol. % Sauerstoff zu erzielende Paarungsrate nicht erreicht wird. Die Werte in 1 Vol.-% Sauerstoff bleiben unabhängig von der Höhe des Wertes $G_{60\ \text{min}}^{20\ \%\ O_2}/G_p$ etwa Δc = 0,5 a unter den Werten von 20 Vol.-% Sauerstoff. Das gilt sowohl für Dunkelgameten

als auch für lichtinduzierte Gameten. Diese Ergebnisse bestätigen, daß die sexuelle Affinität bei Chlamydomonas durch ein dynamisches Gleichgewicht bestimmt ist, bei dem die Synthese durch einen Atmungsprozeß günstig beeinflußt wird. Die sexuelle Aktivierung durch Licht ist offenbar in gleicher Weise vom Sauerstoffpartialdruck abhängig.

Die Versuche zur Ermittlung der Abhängigkeit der Kopulation vom Sauerstoffpartialdruck wurden nach dem gleichen Prinzip durchgeführt, jedoch war der Zeitpunkt des Einleitens der definierten Gasgemische auf Z = 0 h gelegt worden und es ist durchweg um Z = + 2 h fixiert worden. Es wurden Gasgemische mit 1...100 Vol.-% Sauerstoff in Argon auf ihren Einfluß bezüglich der Konzentration von X geprüft. Als Bezugswert für die Auswertung dienten hierbei die in Argon mit 10 Vol.-% Sauerstoff erhaltenen Paarungsraten, d. h. die Werte $G_d^{10\ \%}/G_p$ und somit wurde Δc bestimmt als:

$$\Delta c = c^{x\ \%} - c^{10\ \%} = (\text{Probit } G_d^{x\ \%\ O_2}/G_p - \text{Probit } G_d^{10\ \%\ O_2}/G_p) \cdot a \qquad (59')$$

Die Werte für $G_d^{10\ \%}/G_p$ lagen bei ⊕ im Bereich 5,8...85 %, bei ♂ im Bereich 22...38 %. Die ausgewerteten Messungen sind in Abb. 52 dargestellt. Für die Bestimmungen an ⊕ ist die mittlere quadratische Abweichung s, berechnet nach Formel (51), angegeben. Aus der Abb. folgt, daß man für einen Sauerstoffdruck $\geq$ 1000 mm H_2O den bei der sexuellen Aktivierung von ♂ und ⊕ beteiligten Atmungsprozeß als gesättigt ansehen darf. Bei einem Sauerstoffdruck $<$500 mm H_2O ist er aber deutlich gehemmt. Bei einem Sauerstoffdruck von 100 mm Wasser findet man einen Abfall des Kontrollsubstrates X um $|\Delta c| = (0{,}75 \pm 0{,}12)a$. Der hauptsächlich interessierende Hemmungsgrad als Funktion des Sauerstoffdruckes läßt sich nicht ohne weiteres angeben. Das liegt daran, daß bei Maßzahlen, die die Ausprägung eines biologischen Alternativmerkmals in Form einer relativen Summenhäufigkeit (hier Paarungsraten) angeben, der Quotient (= Q) der unter verschiedenen Bedingungen erhaltenen relativen Sum-

menhäufigkeiten eine Funktion derselben ist. Dagegen sind die Differenzen der Probits der Summenhäufigkeitsprozente ein adäquates von der Höhe der Merkmalsrate unabhängiges Maß für die Hemmung oder Förderung, sofern die Merkmalshäufigkeiten bezüglich der Kontrollgröße normal verteilt sind. Mittels der Differenz der Probits der Summenhäufigkeitsprozente kann der Hemmungsgrad jedoch nur angegeben werden, wenn die absolute Konzentration der Kontrollgröße in Form von Probiteinheiten angegeben werden kann. Das eben gesagte wird durch drei Wertepaare, die an gleichwertigen ⊕-Kulturen bei 10 bzw. 1 Vol.-% Sauerstoff in der Atmosphäre gewonnen wurden, anschaulich demonstriert (s. Tab. 14). Man sieht, daß die Q-Werte mit abnehmender Paarungsrate kleiner werden, wogegen die Differenzen der Probits der Paarungsraten unabhängig von der Höhe der Paarungsraten sich um einen Mittelwert von - 0,64 ± 0,04 Probits bewegen. Damit ist erneut bestätigt, daß die relativen Paarungshäufigkeiten bezüglich der Kontrollgröße X normal verteilt sind. Da für ⊕ die absolute Konzentration der Kontrollgröße X für Normalbedingungen nach Gleichung (24) gegeben ist als: c = a (Probit G/G_p + 62,4), erhält man für eine Paarungsrate von G_d/G_p = 50 % für c_d = 67,4 a. Der Hemmungsgrad der Synthese von X in einer Atmosphäre mit 1 Vol.-% Sauerstoff im Vergleich zu Normalbedingungen ergibt sich hiernach mit dem in Abb. 52 eingetragenen Wert zu: $\Delta c / c_d$ = - 0,75 / 67,4 = - 1,1 %.

Da ♀ anaerob stets bessere Aktivität zeigen als ⊕ oder ♂ ist eine Prüfung der ♀ im Grenzbereich nicht möglich. Um trotzdem eine quantitative Aussage über die Sauerstoffabhängigkeit der ♀ zu erhalten, muß man bei einem Sauerstoffpartialdruck arbeiten, bei dem noch ein ausreichender Prozentsatz von ⊕ oder ♂ paarungsfähig ist. Unter diesen Umständen müßte sich mit ♂ oder ⊕ im mehrfachen Überschuß die Sauerstoffabhängigkeit der ♀ mit dem Paarungstest quantitativ fassen lassen. Um nun zu prüfen, wie ♀ bezüglich ihrer sexuellen Aktivität vom Sauerstoffpartialdruck abhängen, wurde daher in gleicher experimenteller Anordnung wie bisher gearbeitet. Es wurden aber jeweils zwei Manometriegefäße für 1 bzw. 2 Vol.-% Sauerstoff in Argon und 20 Vol.-% Sauerstoff in Argon vorbereitet. Ein Gefäß wurde

mit einem Verhältnis von ♀/⊕ ≈ 5, das andere mit Zellen der gleichen Suspensionen im Verhältnis ⊕/♀ ≈ 5 beschickt. Aus je einem Ansatz mit den gleichen Mischungsverhältnissen wurde G_p bestimmt. In Tab. 15 ist die Auswertung von 2 derartigen Versuchen angegeben. In Versuch I sind bei einem Verhältnis von ♀/⊕ = 4,4 in 2 bzw. 20 Vol.-% Sauerstoff für P/(E + 2 P Werte von 2,04 bzw. 3,42 % ermittelt worden. Da die ♀ in 4,4-facher Konzentration sind und in der Regel höhere Dunkelaktivität zeigen als ⊕, repräsentieren diese Werte den Bruchteil der paarungsfähigen ⊕-Zellen, bezogen auf alle im Ansatz befindliche Zellen. Der Prozentsatz der gepaarten ⊕-Zellen ist daher 2,04 · (4,4 + 1) = 11,0 % bzw. 3,42 · (4,4 + 1) = 18,5 %. Dann war aber in den entsprechenden Ansätzen mit ⊕/♀ = 5,7 der $\frac{5,7}{5,7 + 1}$ = 0,85-fache Teil an paarungsfähigen ⊕-Zellen vorhanden also 9,4 bzw. 15,7 % aller im Ansatz befindlichen Zellen. Die erhaltenen Prozentsätze 3,22 bei 2 Vol.-% Sauerstoff und 4,16 bei 20 Vol.-% Sauerstoff müssen deshalb hier den Prozentsatz der paarungsfähigen ♀-Zellen widerspiegeln. Gleichzeitig ist dadurch gesichert, daß bei den Ansätzen mit ♀/+ = 4,4 ein ausreichender Prozentsatz an paarungsfähigen ♀-Zellen - nämlich $3,22 \cdot \frac{(5,7 + 1) \cdot 4,4}{(4,4 + 1)}$ = 17,6 % bzw. $4,16 \cdot \frac{(5,7 + 1) \cdot 4,4}{(4,4 + 1)}$ = 22,9 % - vorhanden war. Die analoge Betrachtung gilt für die Bestimmung von G_p bei 1100 Lux in Luft. Die aus den Werten bei ♀/⊕ = 4,4 errechneten Paarungsraten G/G_p repräsentieren die Paarungsrate der ⊕-Suspension, die aus den Werten bei ⊕/♀ = 5,7 errechneten Paarungsraten G/G_p die der ♀-Suspension. Die Berechnung von Δc nach (59') liefert für ⊕ - in Übereinstimmung mit den Angaben in Abb. 52 - den Wert - 0,44 a. Entsprechend findet man für ♀ ein Δc = - 0,34 a. Da die Differenzen nicht gesichert sind, ist ein zweiter Versuch bei 1 Vol.-% Sauerstoff gegen 20 Vol.-% Sauerstoff durchgeführt worden. Die Daten hierzu sind die in Tab. 15, Versuch II, angegebenen. Mit der entsprechenden Überlegung wie bei Versuch I läßt sich zeigen, daß die aus den Ansätzen mit ♀/⊕ = 3,2 bzw. ⊕/♀ = 5,0 gewonnenen Werte die Paarungsraten von ⊕ bzw. ♀ repräsentieren. Man errechnet für ⊕ in einer Atmosphäre mit 1 Vol.-% Sauerstoff ein Δc = - 1,10 a und für ♀ entsprechend Δc = - 1,48 a. Die gefundenen Differenzen sind in beiden Fällen hoch signifikant

und stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit der in Abb. 52 für ⊕ und ♂ ermittelten Sauerstoffabhängigkeit überein. Man muß also schließen, daß ♀ in ihrer sexuellen Aktivität prinzipiell in gleicher Weise vom Sauerstoffpartialdruck abhängig sind wie ⊕ und ♂. Für ⊖ dürfte das gleiche zutreffen.

Abschließend sei noch eine Bemerkung darüber gemacht, daß der Sättigungsdruck des Atmungsprozesses, der an der sexuellen Aktivierung von Chlamydomonas beteiligt ist, auffallend hoch liegt, nämlich bei einem Sauerstoffdruck nahe an 1000 mm H_2O. Bei einem Sauerstoffdruck von 500 mm H_2O beobachtet man bereits einen deutlichen Abfall. Dagegen ist die Atmung von Chlorella bei 1/20 dieses Sauerstoffpartialdruckes, nämlich bei 25 mm H_2O noch gesättigt (s. WARBURG et al.[149]). Da der Sauerstoffhalbwertsdruck der Atmung in der Regel um so kleiner ist, je kleiner die Zellen sind (s. WARBURG[145]), muß man für die relativ großen Chlamydomonaszellen natürlich einen höheren Sättigungsdruck erwarten. Der 20-fache Sättigungsdruck gegenüber Chlorella kann aber keinesfalls allein durch den Größenunterschied erklärt werden.

XVII. Der Einfluß von Kohlenmonoxyd auf die sexuelle Aktivität

Nach den bisherigen Ergebnissen über die Sauerstoffabhängigkeit von Gamonsynthese und Paarung konnte man erwarten, daß die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas durch spezifische Atmungsgifte gehemmt wird. Kohlenmonoxyd erwies sich dabei als ein besonders wertvolles Spezifikum.

a) Methodik

Das verwendete Kohlenmonoxyd wurde anfangs durch Eintropfen von HCOOH in 70 °C heiße konzentrierte H_2SO_4 dargestellt und mit 33 %iger NaOH zweimal gewaschen (FISCHER[36]). Später kam käufliches Kohlenmonoxyd zur Anwendung. Die Versuche selbst wurden in manometrischer Anordnung mit dem Paarungstest durchgeführt und liefen im Dunkeln ab. Dabei wurden die Zellen ana-

log den Versuchen zur Sauerstoffabhängigkeit (XVI 2 a) zuerst 20 min in Argon gehalten, dann die Testzellen eingekippt und anschließend die definierten Gasgemische durchgeleitet. Die Gasgemische enthielten Kohlenmonoxyd (= CO), Sauerstoff (= O_2) und Argon (= Ar).in wechselndem Prozentsatz. Indem die Paarungsrate in jedem Versuch bei gleichen Sauerstoffdrucken unter Zusatz von Kohlenmonoxyd oder Argon bestimmt wurde, waren Einflüsse, die von der Variation des Sauerstoffpartialdruckes herrühren konnten, ausgeschaltet. Die Hemmung wurde in Anlehnung an Gleichung (59') berechnet als Δc in a-Einheiten, bezogen auf die Argonkontrollen. Die angegebenen Fehlerbereiche entsprechen der nach (51) berechneten mittleren quadratischen Abweichung $\pm$ s oder wenn nur eine Bestimmung vorliegt, dem nach (10) berechneten theoretischen Stichprobenfehler $\pm \sigma$.

b) Ergebnisse

Versuche an ♂

Die Versuche an ♂ sind mit ♀ als Testklon durchgeführt worden. Die Ergebnisse aller Versuche, die zeitlich so lagen, daß im Bereich Z = 0...+1 h das Mischen der Geschlechter und Einleiten der definierten Gasgemische erfolgte - fixiert wurde 1,5...3 h nach dem Einleiten - sind in Tab. 16 a zusammengefaßt. Man sieht, daß die Hemmung der Paarung bei konstantem Sauerstoffpartialdruck mit anwachsendem Kohlenoxydpartialdruck zunimmt. Andererseits nimmt die Hemmung aber bei konstantem Kohlenoxydpartialdruck mit steigendem Sauerstoffpartialdruck ab. Bei gleichem Verhältnis von Sauerstoff- zu Kohlenoxydpartialdruck erscheint gleiche Hemmung. Die hemmende Wirkung des Kohlenoxydes auf die Paarung wird also nicht durch den absoluten Kohlenoxydpartialdruck bestimmt, sondern durch das Verhältnis der Partialdrucke von Kohlenoxyd und Sauerstoff. Dies ist ein wichtiges Ergebnis. Es folgt nämlich daraus, daß das Kohlenoxyd mit dem Sauerstoff um die reduzierten Bindungsvalenzen eines "sauerstoffübertragenden Fermentes" konkurriert, welches am Ablauf der Paarung beteiligt ist (vgl. hierzu WARBURG[145]).

Versuche an ♀

Unter den gleichen Bedingungen erhält man für ♀ mit ♀ als Testklon das prinzipiell gleiche Ergebnis wie bei ♂ (Tab. 16 b). Während bei CO/O_2 = 1 bei ♂ ein $\Delta c \approx -0{,}3$ a erschien, ergab sich für ♀ ein Wert von $\Delta c \approx -0{,}6$ a. Die ♀-Zellen sind also gegenüber Kohlenoxyd empfindlicher als ♂. Hinter diesem Unterschied konnte sich ein artspezifischer Affinitätsunterschied zwischen dem "sauerstoffübertragenden Ferment" und dem Sauerstoff bzw. dem Kohlenoxyd verstecken. Der Wirkungsunterschied kann jedoch auch dadurch bedingt sein, daß die Kontrollfunktion des "sauerstoffübertragenden Ferments" bei der Synthese der sexuellen Affinität in beiden Klonen verschieden stark ausgeprägt ist, d. h. daß das Konzentrationsverhältnis zwischen den "Schrittmachern" (= Fermente, Substrate) der Synthesekette verschieden ist. Da die Synthese der sexuellen Affinität als ein durch eine Reaktion 2. Ordnung kontrollierter Mechanismus erscheint (s. u. XII 4 a), ist das letztere wahrscheinlicher. Unter diesem Gesichtspunkt schien es wertvoll zu prüfen, ob nicht sogar innerhalb eines Klones die Empfindlichkeit der Kopulation gegenüber Kohlenmonoxyd im Tagesverlauf schwankt. Ehe diese Frage verfolgt wird, soll noch über einige Versuche an ♀ berichtet werden.

Versuche an ♀

Auch an ♀ konnte der hemmende Einfluß von Kohlenmonoxyd auf die Paarung nachgewiesen werden. Dabei wurde wir bei den Versuchen zum Nachweis der Sauerstoffabhängigkeit der ♀ mit ♀ als Testklon im mehrfachen Überschuß gearbeitet. Dadurch konnte wie oben gesichert werden (s. u. XVI 2 b), daß genügend paarungsfähige ♀-Zellen im Ansatz waren. Die Daten von zwei Versuchen sind in Tab. 17 angegeben. Die in einem Gemisch mit 90 Vol.-% CO und 10 Vol.-% O_2 erhaltene Hemmung der Paarung stimmt innerhalb der Fehlergrenzen mit der bei ♀ und ♂ gefundenen Hemmung überein. Da bei Versuchen mit ♀ das Verhältnis ♀/♀ = f $\geqq$ 5 sein soll, werden die Stichprobenfehler zur Bestimmung der Paarungsraten von ♀ bei gleichem experimentellem Aufwand rund 2...3 mal so groß wie bei ♀ oder ♂, bei denen im allgemeinen ein f $\approx$ 2 ausreicht. Um den Nachweis zu erbringen, daß auch bei ♀ die Paarungshemmung durch Kohlenmonoxyd vom Verhältnis CO/O_2 abhängt,

wäre daher der 4...9-fache experimentelle Aufwand notwendig. Aus diesem Grund ist die Bearbeitung dieser Frage ausgelassen. Man wird aber annehmen, daß bei ♀ und auch bei ⊖ ähnliche Verhältnisse vorliegen wie bei ⊕ und ♂.

XVIII. Schwankungen der Kohlenmonoxydempfindlichkeit der sexuellen Aktivität und zur Frage der Wirkung von Licht auf die Hemmung der sexuellen Aktivität durch Kohlenmonoxyd

Aus einem Versuch an ♂, der abweichend gegenüber den bisherigen Versuchen nicht ab Z = 0...+ 1 h, sondern erst ab Z = + 5 h durchgeführt wurde (s. Tab. 18 a, Zeile 1 und 2), ergab sich bei einem Verhältnis von CO/O_2 = 60 Vol.-%/15 Vol.-% = 4/1 eine Hemmung von $\Delta c = (- 1{,}13 \pm 0{,}13) \cdot a$. Bei gleichem CO/O_2 -Verhältnis wäre bei einem Versuch ab Z = 0...+ 1 h eine Hemmung von $\Delta c = - 0{,}5$ a zu erwarten gewesen, wie man der Tab. 16 a entnimmt. Der beobachtete Hemmungszuwachs bzw. die erhöhte Empfindlichkeit der Kopulation gegenüber Kohlenmonoxyd ist also hoch signifikant. Wegen des Abfalls des Dunkelgametentiters in den ersten Tagesstunden (s. Abb. 21 b) war es nicht möglich, die Kohlenoxydempfindlichkeit der Kopulation an Dunkelgameten im Tagesverlauf mit ausreichender Genauigkeit weiter zu verfolgen. Zur weiteren Bearbeitung dieser Frage mußten daher lichtinduzierte Gameten verwendet werden. Zu diesem Zweck wurden die Manometriegefäße vom Zeitpunkt des Einleitens der definierten Gasgemische an von oben mit einer OSRAM-Leuchtstofflampe vom Typ HNW 120 belichtet. Es ist hierbei zu berücksichtigen, daß die Hemmung der Kopulation durch Kohlenmonoxyd, falls sie über eine Hemmung der Cytochromoxydase zustande kommt, lichtreversibel sein muß. Für die Lichtempfindlichkeit L der Kohlenoxydverbindung des sauerstoffübertragenden Fermentes gilt nach WARBURG[145] die Beziehung

$$L = \frac{\varphi \cdot \beta}{z_d} = \frac{1}{I} \cdot \frac{K_h - K_d}{K_d} \qquad (60)$$

wobei einerseits β der Lichtabsorptionskoeffizient der Kohlenoxydverbindung des Fermentes, φ die photochemische Ausbeute

bei der Spaltung der Kohlenoxydverbindung und z_d die Dunkelzerfallskonstante der Kohlenoxydverbindung; andererseits K_d der Dunkelwert der Verteilungskonstanten, K_h der Wert der Verteilungskonstanten bei der Intensität I. WARBURG und Mitarbeiter fanden an Hefe für λ = 436 nm und die Temperatur 10 °C einen Wert: $L \approx 1{,}2 \cdot 10^4$ cm^2·min/cal. Wegen der Temperaturabhängigkeit von L - bedingt durch die Temperaturabhängigkeit von z_d - würde man für 20 °C einen Wert von $L \approx 2{,}6 \cdot 10^3$ cm^2·min/cal erwarten. Zu einer Erhöhung der Verteilungskonstanten auf das zweifache, d. h. zur Erniedrigung der Atmungshemmung auf die Hälfte, wäre bei 20 °C also nach (60) eine Intensität $I = \frac{1}{L} \approx 3{,}8 \cdot 10^{-4}$ cal/cm^2·min = 265 erg/cm^2·sec notwendig. Wenn bei Chlamydomonas ähnliche Verhältnisse vorliegen, so sollte man erwarten, daß unter den gegebenen Bedingungen Intensitäten von einigen hundert erg/cm^2·sec die Kopulationshemmung in einer kohlenoxydhaltigen Atmosphäre auf etwa die Hälfte reduzieren. Das müßte größenordnungsmäßig auch für das in den Versuchen verwendete "weiße Licht" zutreffen, da dieses auf Grund seiner spektralen Energieverteilung von der Cytochromoxydase besonders gut absorbiert wird. Komplizierend bei den Versuchen ist, daß die Zellen durch Licht prinzipiell sexuell aktiviert werden. Es ist daher nur möglich, eine Lichtempfindlichkeit der Kohlenoxydhemmung nachzuweisen, wenn die Kohlenoxydhemmung so stark ist, daß die Enthemmung durch Licht sich bemerkbar macht, ehe das Gros der Zellen auf Grund der normalen Lichtaktivierung kopulationsfähig wird. Man wird deshalb bei großem CO/O_2-Verhältnis arbeiten. Eine Erniedrigung der Versuchstemperatur bringt bei Chlamydomonas keinen Vorteil, da die Synthese der sexuellen Affinität bei tieferen Temperaturen begünstigt wird (s. u. X 3). Ein erster Versuch mit ♂ ab Z = + 3 h bei 283 erg/cm^2·sec (Tab. 18 a, Zeile 3), ergab nun bei einem CO/O_2-Verhältnis von 7/1...9/1 nur Hemmungen von Δc = - (0,25...0,38)a. Die Hemmung ist also nur ein Bruchteil gegenüber den Hemmungen die im Bereich Z = 0...+ 5 h an Dunkelgameten erhalten wurden. Die einzig mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, daß die Hemmung der Kopulation durch Kohlenmonoxyd lichtempfindlich ist. Ein zweiter Versuch, der ab Z = + 10 h bei ebenfalls 284 erg/cm^2·sec (Tab. 18 a, Zeile 4) durch-

geführt wurde, ergab für CO/O_2 = 7/1...9/1 Hemmungen von Δc = -(0,34...0,68)a. Die Tendenz zum Ansteigen der Empfindlichkeit gegenüber Kohlenmonoxyd mit zunehmender Tageszeit ist also unverkennbar. Man wird einwenden, daß dies vielleicht daran liegt, daß die Zellen bei den Versuchen ab Z = 0...+ 1 h 12 h vor Versuchsbeginn suspendiert worden sind, wogegen sie bei den Versuchen ab Z = + 10 h schon 22 h vorher suspendiert waren. Dieser Einwand kann durch einen Versuch (Tab. 18 a, Zeile 5) leicht entkräftet werden. Die ♂-Zellen wurden hierzu erst um Z = + 4 h suspendiert und der Versuchsbeginn lag bei Z = + 11 h. Die Zellen sind also nur 7 h suspendiert gewesen. Es sei bemerkt, daß unter diesen Umständen auch z. Zt. Z = + 11 h ein bemerkenswerter Prozentsatz an Dunkelgameten auftritt (vgl. Abb. 25). Der Versuch lief unter Bestrahlung mit 306 erg/cm^2·sec weißen Lichte ab. Für CO/O_2 = 7/1...9/1 liegt die errechnete Hemmung im Bereich Δc = - (0,89...1,37)a. Der Trend zum Hemmungsanstieg mit zunehmender Tageszeit nimmt also nach kürzeren Suspendierzeiten nicht ab, im Gegenteil, er erscheint sogar noch größer.

Für eine weitere Sicherung des Hemmungsanstieges sind Versuche an ♀ besser geeignet, da ♀ bezüglich der Kopulation gegenüber Kohlenmonoxyd empfindlicher sind (vgl. Tab. 16). Dem Versuch aus Tab. 18 b, Zeile 1 entnimmt man, daß 6 h nach dem Suspendieren an Dunkelgameten von ♀ bei einem Verhältnis von CO/O_2 = 9/1 um Z = - 6 h eine Hemmung von $\Delta c \approx -0{,}5$ a erscheint. Dagegen ergab sich um Z = 0 h (vgl. Tab. 16) unter gleichen Bedingungen eine Hemmung von $\Delta c \approx -1{,}3$ a. Dunkelgameten von ♀ sind also um Z = - 6 h gegenüber einer Hemmung durch Kohlenmonoxyd um einen Faktor 2...3 unempfindlicher als um Z = 0 h. Ein Versuch ab Z = + 13 h, nach ebenfalls 6-stündigem Suspendieren der Zellen an Dunkelgameten durchgeführt, lieferte bei gleichem CO/O_2-Verhältnis eine Hemmung von $\Delta c \approx -2{,}4$ a (s. Tab. 18 b, Zeile 2). Die ♀-Zellen sind also ähnlich ♂ bei Tagende gegenüber Kohlenmonoxyd nahezu doppelt so empfindlich wie bei Tagbeginn.

Einige Versuche bei Tagende mit lichtinduzierten Gameten (Tab. 1 Zeile 3 bis 5) zeigen, daß auch bei ♀ die Kopulationshemmung durch Kohlenmonoxyd lichtempfindlich ist. Sogar bei weiterer Ver

kleinerung der Suspendierzeiten auf 4 h, wobei die Kohlenoxydempfindlichkeit der Kopulation ansteigt (s. o.), wird die an Dunkelgameten erhaltene Hemmung nicht erreicht.

Aus den vorstehenden Versuchen lassen sich bereits einige wichtige Schlüsse ziehen. Da die Kohlenoxydhemmung der Kopulation bei ♀ und ♂ vom Verhältnis CO/O_2 abhängt und lichtempfindlich ist, muß die Wirkungsgruppe des gehemmten Fermentes Eisen sein (s. WARBURG[145]). Dies steht in voller Übereinstimmung mit der Voraussage, die auf Grund des Wirkungsspektrums (s. u. XV) der sexuellen Aktivierung gemacht worden ist. Nach diesem Ergebnis kann es als sicher gelten, daß es die Cytochromoxydase ist, die unter den hier gewählten Bedingungen als Schrittmacher in der Atmungskette die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas reguliert. Da der Synthesemechanismus der sexuellen Affinität als eine Reaktion 2. Ordnung erscheint (s. u. XII 4 a), ist es nicht überraschend, daß die Kohlenoxydempfindlichkeit der Kopulation im Tagesverlauf schwankt. Nach den bisher vorliegenden Ergebnissen sieht es so aus, als ob die Schrittmacherfunktion der Cytochromoxydase gegen Tagende am stärksten ausgeprägt ist, d. h. gegen Tagende wird die sexuelle Aktivität hauptsächlich durch den Durchsatz in der Atmungskette begrenzt. Andererseits erscheint die Kopulation kurz vor Tagbeginn relativ unempfindlich gegenüber Kohlenmonoxyd. Zu dieser Zeit sollte man daher einen hohen Durchsatz in der Atmungskette erwarten, sodaß sich eine partielle Atmungshemmung auf die sexuelle Aktivität nur sehr wenig auswirkt; d. h. die Schrittmacherfunktion der Atmungskette ist zu dieser Zeit weniger stark ausgeprägt. Dieses Verhalten zeichnet sich auch schon in den Versuchen zur Sauerstoffabhängigkeit ab (s. XVI). Bei den Versuchen ab Z = - 2 h hatte sich bei 1 Vol.-% O_2 in der Atmosphäre ein $\Delta c \approx - 0{,}5$ a ergeben (vgl. Abb. 51). Demgegenüber liefern die ab Z = 0 h durchgeführten Versuche (vgl. Abb. 52 und Tab. 15) bei 1 Vol.-% O_2 ein $\Delta c \approx (-0{,}75 \ldots - 1{,}1)$ a. Wenn der Unterschied auch nicht gesichert ist, so ist er doch auffallend.

XIX. Die Bedeutung der Cytochromatmung für die sexuelle Aktivität

1. Die Verteilungsgleichung

Nimmt man für die Verteilung der Cytochromoxydase zwischen Sauerstoff und Kohlenoxyd die Gültigkeit der Beziehung

$$\frac{Fe\ O_2}{Fe\ CO} \cdot \frac{CO}{O_2} = K \qquad (61)$$

an (vgl. WARBURG[145]), so kann man das Verhältnis $Fe\ O_2/Fe\ CO$ aus der Kopulationshemmung berechnen. Ist c_d die Konzentration des Kontrollsubstrates bei nicht gehemmter Kopulation und $c_{d'}$ die bei kohlenoxydgehemmter Kopulation verbleibende Konzentration und ferner: $Fe\ O_2 + Fe\ CO = \Sigma\ Fe$, so setzt man $c_{d'}/c_d = Fe\ O_2/\Sigma\ Fe$ und $(c_d - c_{d'})/c_d = Fe\ CO/\Sigma\ Fe$. Dann ist

$$\frac{Fe\ O_2}{Fe\ CO} = \frac{c_{d'}}{c_d - c_{d'}} \qquad (62)$$

und man kann an Stelle von (61) schreiben:

$$\frac{c_{d'}}{c_d - c_{d'}} \cdot \frac{CO}{O_2} = K \qquad (63)$$

Die maximale Empfindlichkeit gegen Kohlenoxyd war bei ♀ um Z = + 13 h erschienen. Bei einem Dunkelgametentiter von G_d/G_p = 74 %, d. h. bei $c_d \approx (62,4 + 5,6)$ a = 68,0 a und einem Verhältnis CO/O_2 = 9/1 hatte sich eine maximale Hemmung von $\Delta c \approx -2,4$ ergeben. Da im allgemeinen das Verhältnis CO/O_2, das halbe Hemmung der Cytochromoxydase bewirkt, im Bereich 10...30 liegt, (s. WARBURG[145]), kann man $c_{d'}$ mit diesen Daten nach (63) berechnen. Aus $(c_{d'}/2,4 \cdot a) \cdot (9/1) = 10...30$ folgt für $c_{d'}$ = (2,7... 8,0) a. Hiermit berechnet sich für die Konzentration des Kontrollsubstrates X, die einer Hemmung durch Kohlenoxyd zugänglich ist, ein Wert von

$$c_d = c_{d'} + (c_d - c_{d'}) = ((2,7...8,0) + 2,4)\ a = (5,1...10,4)a$$

Das bedeutet, daß die bei der Synthese von X beteiligte Cytochromatmung bis zu

$$\frac{68,0 \cdot (5,1...10,4)}{68,0} = 92,5...84,7\ \%$$

funktionell durch einen anderen Stoffwechselprozeß ersetzt werden kann. Man muß hier an eine nicht kohlenoxydhemmbare Atmung oder Gärung denken. Auf jeden Fall scheint der Ablauf der Paarung nicht obligatorisch an den Ablauf der kohlenoxydhemmbaren Cytochromatmung gebunden zu sein. Die Cytochromatmung ist unter den hier gewählten Bedingungen aber der dominierende Regulator für die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas. Zu einer weiteren Spezifizierung dieser Aussage führen die folgenden Versuche.

2. Agglutination und Paarung in Kohlenoxyd

Bringt man Proben einer ♁-Suspension mit einem Dunkelgametentiter von G_d/G_p = 40...60 % und einer ♀-Suspension mit einem Dunkelgametentiter von $G_d/G_p > 70$ % in die Gaskammer (s. u. XVI 1 a) und beginnt unmittelbar nach dem Mischen der Geschlechter mit dem Durchströmen von Kohlenmonoxyd, so beobachtet man das gleiche Verhalten wie unter Argon (s. XVI 1 b). Nach 20...30 min ist die Agglutination völlig abgeklungen. Bringt man ein solches Gemisch wieder in Luft, so ist nach < 5 min die Agglutination wieder voll in Gange und die Paarung läuft normal ab. Die Kohlenoxydhemmung der Kopulation ist also reversibel. Dies ist in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß die Wirkungsgruppe des gehemmten Fermentes ein Schwermetall, nämlich Eisen, ist.

Bei sehr gut reagierenden Kulturen ($G_d/G_p > 80$ %) findet man - entsprechend den Versuchen in Argon - auch nach 2-stündigem Aufenthalt in Kohlenmonoxyd noch schwache Gruppenbildung; aus den Gruppen werden jedoch nur vereinzelt Pärchen frei. Erwartungsgemäß sind ♁ - und ♀-Zellen, die längere Zeit in einer Kohlenoxydatmosphäre gehalten waren, unmittelbar nach Überführung in Luft auch in ihrer Agglutinierfähigkeit gegenüber vollaktiven Zellen des anderen Geschlechts stark gehemmt. Analog der in XVI 1 b gegebenen Betrachtung, muß man also anaerob be-

reits die Gamonsynthese als gehemmt ansehen. Die Plasmabrückenbildung zwischen den Kopulationspartnern erscheint aber stärker gehemmt. Da Kohlenoxyd die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas durch Hemmung der Cytochromoxydase, also der Atmung, hemmt, kann man sicher sein, daß selbst wenn in der Kohlenoxydatmosphäre noch Spuren von Sauerstoff vorhanden sind, sich diese funktionell über die Cytochromatmung nicht mehr auswirken können. Daß trotzdem die sexuelle Aktivität unter Kohlenoxyd wie unter Argon bei sehr gut reagierendem Material bei einem Teil der Population erhalten bleibt, kann man zwanglos erklären, wenn man annimmt, daß die Konzentration des Kontrollsubstrates X unter anaeroben Bedingungen um einen bestimmten Wert abfällt, der bei einer Population mit einem Dunkelgametentiter < 60 % dazu ausreicht daß die sexuelle Aktivität praktisch bei allen Zellen verschwindet. Ist der Dunkelgametentiter einer Population aber > 70 %, so reicht die bei Anaerobiose verbleibende Restkonzentration von X bei einem Teil der Population noch zur Aufrechterhaltung der Agglutinierfähigkeit aus. Bei besonders gut reagierendem Material ($G_d/G_p > 90$ %) können anaerob sogar noch Pärchen gebildet werden.

Bei den obigen Versuchen war bei ⊖-Kulturen mit einem Dunkelgametentiter von $G_d/G_p \approx 50$ %, t = 1200...1800 sec = 1500 ± 300 sec nach dem Überführen in eine sauerstofffreie Atmosphäre die Agglutinierfähigkeit der Zellen verschwunden, d. h. der Gametentiter war auf einen Wert $G_{d'}/G_p \rightarrow 0$ abgesunken. Mit diesen Daten kann man aus der nach (13) modifizierten Gleichung für die Rückreaktion

$$(c - c_{d'}) = (c_d - c_{d'}) \cdot e^{-kt} \qquad (13')$$

berechnen, auf welchen Wert die Konzentration des Kontrollsubstrates X (= $c_{d'}$) bei ⊖ während Anaerobiose abfällt. Hierbei ist für die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion von ⊖ der aus Abb. 19 entnommene Wert $k_{20°\ominus} \approx 5 \cdot 10^{-4}$ sec^{-1} und nach (24) für c = (Probit G/G_p + 62,4)·a zu setzen. Mit c_d = 67,4 a und $c \approx 62{,}4$ a errechnet sich aus dem Ansatz:

$$(62{,}4\ a - c_{d'}) = (67{,}4\ a - c_{d'}) \cdot e^{-5 \cdot 10^{-4} \cdot (1500 \pm 300)}$$

für die anaerobe Restkonzentration von X ein Wert von $c_{d'}$ = (57,8 ± 1,2)·a. Die Konzentration des Kontrollsubstrates X fällt hiernach bei ⊕ unter anaeroben Bedingungen um Δc = (67,4 - 57,8 ± 1,2)·a = (9,6 ± 1,2)·a ab. Dies entspricht bei einer Anfangskonzentration von c = 67,4·a einer Konzentrationserniedrigung von X um 14 ± 2 %.

Bei einem Versuch mit dem Paarungstest in manometrischer Anordnung ausgeführt, ergab sich an einer ⊕-Kultur mit G_d/G_p = 90 % bei Einkippen der ♀ nach 20-minutigem Aufenthalt in Argon noch eine Paarungsrate von $G_{d'}/G_p$ = 0,45 %. Hieraus berechnet sich nach (13') für die anaerobe Restkonzentration von X: $c_{d'}$ = 60,0 a. Dieser Wert liegt bereits unter der kritischen Grenzkonzentration c = 62,4 a, bei der ⊕-Zellen noch paarungsfähig sind. Die Konzentrationserniedrigung von X wäre in diesem Fall also zu Δc = (68,7 - 60,0)·a = 8,7·a anzunehmen, in guter Übereinstimmung mit der vorangehenden Berechnung.

Daneben gibt es dann erwartungsgemäß Versuche, bei denen bei einem Dunkelgametentiter $G_d/G_p \rightarrow$ 100 %, d. h. bei $c_d \approx$ 72 a auch bei Aufenthalt in einer Kohlenoxydatmosphäre von Z = - 3 h ab, um Z = 0...+ 1 h noch Gruppen- und Pärchenbildung abgelaufen ist. Dieses Ergebnis ist von fundamentaler Wichtigkeit, es zeigt nämlich, daß das Kontrollsubstrat X prinzipiell auch durch den anoxybiontischen Stoffwechsel der Zelle in einer Menge gebildet werden kann, die zum Ablauf von Gamonsynthese, Agglutination und in begrenztem Maße auch Paarung ausreicht. Der Ablauf der Paarung ist also nicht obligatorisch an die Anwesenheit von Sauerstoff gebunden. Die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas läßt sich unter den hier gewählten Bedingungen aber durch Regulierung der Atmung nahezu vollkommen regulieren.

XX. Zur Charakterisierung des anoxybiontischen Stoffwechsels

FRENKEL[43] hat gezeigt, daß ältere Flüssigkulturen von C. moewusii Θ unter anaeroben Bedingungen neben Kohlendioxyd (= CO_2) auch Wasserstoff (= H_2) entwickeln. Es wurde daher geprüft, ob und in welchem Umfang diese Eigenschaft auch unter den hier verwendeten Bedingungen auftritt.

1. Wasserstoffentwicklung unter anaeroben Bedingungen

a) Methodik

Die Gaswechselmessungen wurden mit der manometrischen Methode entsprechend den Angaben unter VIII a durchgeführt. Dabei kamen kegelförmige Gefäße mit einer Birne und zylindrischem Einsatz zur Anwendung (Volumen 12,2...16,3 cm^3). Als Absorbens für Wasserstoff diente 20 mg trockener Palladiumasbest im Einsatz. Absorbens für Kohlendioxyd war 0,3 cm^3 20 %iges KOH in Einsatz oder Birne. Der Gasraum enthielt Argon. Die Zellen wurden wie unter VIII angegeben, behandelt. 3...4 cm^3 solcher Zellsuspensionen mit w = $(5...6)\cdot10^{-3}$ kamen kurz vor Versuchsbeginn in den Hauptraum der Manometriegefäße. Das Thermobarometergefäß wurde an Stelle von Zellsuspension mit S beschickt.

b) Ergebnisse

Bei Versuchen an Θ, im Zeitraum Z = - 1...+ 4 h (pH = 6,5...6,7) im Dunkeln durchgeführt, traten in Argonatmosphäre mit Kalilauge im Einsatz stets positive Drucke auf. Nur in Gefäßen, die neben Kalilauge auch Palladiumasbest enthielten, traten keine Druckänderungen auf. Die positiven Drucke sind deshalb einer Wasserstoffentwicklung zuzuschreiben. Für die Bildung von Wasserstoff unter anaeroben Bedingungen errechneten sich Werte von $Q_{H_2}^{Ar}$ = 0,17...0,20 mm^3 H_2/mm^3 Zellen · h. Für entsprechende Versuche an Θ bei pH = 6,5, bei denen nur Palladiumasbest zur Absorption des Wasserstoffs in den Einsätzen war, läßt sich die

unter Berücksichtigung der Retention korrigierte Gefäßkonstante für CO_2 mit hinreichender Genauigkeit berechnen nach:

$$k'_{CO_2} = \frac{V_G \cdot \frac{273}{T} + V_F \cdot \alpha(1 + \text{num log } (pH - pK'))}{p_o} \qquad (64)$$

wobei die scheinbare erste Dissoziationskonstante der Kohlensäure für 20 °C als pK' = 6,36 angenommen wurde. Man findet auf diese Weise für das unter anaeroben Bedingungen gebildete Gärungskohlendioxyd bei ⊕ Werte von $Q^{Ar}_{CO_2}$ = 0,48...0,68 mm^3 CO_2/mm^3 Zellen · h. Damit ergeben sich für das Verhältnis von Wasserstoff zu Kohlendioxyd, wie es von ⊕ unter anaeroben Bedingungen (in Argon) im Dunkeln gebildet wird, Werte von

$$Q^{Ar}_{H_2} / Q^{Ar}_{CO_2} = 0,25...0,42.$$

Diese Werte stimmen mit den Angaben von FRENKEL[43] für ⊖ gut überein.

Auch ♂ und ♀ entwickeln anaerob im Dunkeln neben Kohlendioxyd Wasserstoff, wie bereits STIFTER[130] gefunden hat. Chlamydomonas ist also zu einer Gärung befähigt, bei der neben Kohlendioxyd auch Wasserstoff entsteht.

2. Über das Endprodukt der anaeroben Glykolyse

Zur weiteren Charakterisierung der Gärung ist von Bedeutung, daß Zellsuspensionen, die einige Stunden anaerob gehalten waren, gegenüber den Luftkontrollen (Ansätze in beiden Fällen in Schliffstopfenflaschen) eine um 0,1...0,2 pH saurere Reaktion zeigen. Es lag daher nahe zu prüfen, ob unter anaeroben Bedingungen eine organische Säure ins Medium ausgeschieden wird.

a) Methodik

♀-Suspensionen wurden um Z = - 3...- 2 h geteilt. Ein Teil blieb unter Luft; der andere Teil wurde unter anaerobe Be-

dingungen (Argon) gebracht. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Zellen abgeschleudert (10 min 1000 g). 5 cm^3 des Überstandes wurden mit 0,2 cm^3 einer 1 n $FeCl_3$-Lösung versetzt und 15 min nach dem Mischen in 1-cm-Küvetten bei 405 nm photometriert (Photometer EPPENDORF) gegen 5 cm^3 S mit 0,2 cm^3 1 n $FeCl_3$-Lösung.

b) Ergebnisse

Das Ergebnis eines Versuches mit ♀($w = 5 \cdot 10^{-3}$) ist in Tab. 19 dargestellt. Man entnimmt der Tab., daß unter anaeroben Bedingungen eine Substanz, die mit Ferriionen einen Komplex bildet, in erhöhtem Maße ins Medium ausgeschieden wird. Die fragliche Substanz wird nach Überführung in aerobe Bedingungen von den Zellen im Dunkeln nicht mehr resorbiert oder abgebaut. Auf Grund der farblichen Reaktion (= rotbraun) mit Ferriionen dürfte es sich um eine niederkettige Fettsäure bzw. Oxysäure handeln. Das wird auch durch die Untersuchungen von ALLEN[2] gestützt, wonach verschiedene Chlamydomonaden - unter anderem C. eugametos und C. moewusii - bereits unter Normalbedingungen Glykolsäure, Pyruvat und Oxalsäure ins Medium abgeben. Die Extinktion $\varepsilon = 0{,}190$ bei 405 nm würde z. B. einer Konzentration von $\approx 5 \cdot 10^{-3}$ mol Acetat entsprechen. Für den Stoffwechsel der Zelle bedeutet dies jedenfalls einen irreversiblen Energieverlust unter anaeroben Bedingungen. Es ist somit verständlich, daß Zellsuspensionen, die längere Zeit anaerob gehalten waren, auch nach Rücküberführung in aerobe Bedingungen in ihrer sexuellen Aktivität gegenüber den Luftkontrollen gehemmt erscheinen. Ob teilweise auch eine echte Hemmung durch die während Anaerobiose ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte bedingt wird, ist noch nicht untersucht.

XXI. Versuche mit Hillreagenzien

Es ist natürlich naheliegend zu prüfen, ob die Funktion des Sauerstoffs bei der Paarung von Chlamydomonas durch einen

Elektronenacceptor in Form von Parabenzochinon oder Kaliumferricyanid ersetzt werden kann.

a) Methodik

Das Parabenzochinon wurde nach VANINO durch Wasserdampfdestillation gereinigt und in n/100 H_2SO_4 gelöst, wie von WARBURG[145] s. 176 empfohlen. Das Kaliumferricyanid war p. a. Substanz von der Fa. MERCK.

b) Ergebnisse

Parabenzochinon hemmte bereits aerob in einer Konzentration von $\geq 10^{-5}$ mol die Agglutination und Beweglichkeit der Zellen deutlich. Dagegen hatten Konzentrationen bis zu $5 \cdot 10^{-4}$ mol $K_3Fe(CN)_6$ aerob keinen hemmenden Einfluß auf Beweglichkeit und sexuelle Aktivität von Chlamydomonas. Trotzdem ließ sich anaerob die Gruppenbildung oder Paarung durch Zugabe von $10^{-6}...10^{-3}$ mol Ferricyanid (pH 6,7...7,0) nicht verbessern. Maskiertes Eisen in Form von Ferricyanid kann also die Funktion des Sauerstoffes bei der Agglutination und Paarung von Chlamydomonas nicht ersetzen. Der Grund könnte z. B. sein, daß Ferricyanid gar nicht an den Funktionsort gelangt oder daß das Redoxpotential des Systems zu klein ist. Aus dem negativen Ergebnis können deshalb keine Schlüsse bezüglich der Funktion des Sauerstoffs bei der sexuellen Aktivierung gezogen werden.

XXII. Der Sauerstoffverbrauch und seine Beeinflussung durch sichtbare Strahlung

Aus den Ergebnissen von XVIII wurde bereits gefolgert, daß die Schrittmacherfunktion der Atmungskette bei der Synthese der sexuellen Affinität bei Tagbeginn schwächer ausgeprägt ist als am Abend. Hiernach könnte man erwarten, daß die Atmungsgröße im Tagesverlauf schwankt. Nachfolgend werden daher einige Versuche mitgeteilt, bei denen die Atmung von Chlamydomonas über

mehrere Tage verfolgt worden ist. Gleichzeitig damit wurde geprüft, ob die sexuelle Aktivierung durch sichtbare Strahlung mit einer Lichtatmungsreaktion gekoppelt ist. Dies ist nach den bisher vorliegenden Ergebnissen durchaus zu erwarten. Denn wenn die sexuelle Aktivierung durch sichtbare Strahlung über Anregung der Cytochromoxydase erfolgen kann, so müßte damit auch eine Erhöhung des Durchsatzes in der Atmungskette gekoppelt sein.

a) Methodik

Eine unbedingte Voraussetzung bei diesen Versuchen ist steriles Arbeiten. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen wurde in manometrischer Anordnung gemessen. Manometer, Gefäße und die übrigen Bedingungen bei der Manometrie waren die gleichen wie in VIII a angegeben. Im Gasraum war Luft oder Sauerstoff. Als Absorbens für Kohlendioxyd war bis zu 1 cm^3 20 %iges KOH in Einsatz und Anhang. Die Versuche liefen im Dunkeln. Die Manometerablesungen erfolgten in Abständen von 20 bis 120 min. Die Gefäße wurden mit 3 cm^3 Zellsuspension mit w = (8...18)$\cdot 10^{-3}$ bzw. mit 3 cm^3 S beschickt. In einem Fall wurden die Zellen palmelloid auf dem Boden der Manometriegefäße ausgestrichen und der Sauerstoffverbrauch für das Palmellastadium gemessen. Anschließend wurden 3 cm^3 S zugegeben und die Atmung wurde weiter verfolgt. Bei Versuchsende wurden die Zelldichten w der Suspensionen bestimmt und auf diese Weise die eingesetzten Zellmengen und Atmungsgrößen Q_{O_2} in mm^3 O_2 / mm^3 Zellen · h errechnet.

b) Ergebnisse

Ein erster Versuch an ♂ (Abb. 53 $♂_1$) mit Luft im Gasraum zeigte, daß der Sauerstoffverbrauch der Zellen nach dem Suspendieren zunächst etwa 6 h lang ansteigt bis auf einen Wert von Q_{O_2} = 1,5. Von der 6. bis 12. h nach dem Suspendieren fällt Q_{O_2} bis auf 0,85, steigt aber dann z. Zt. des erwarteten Tagbeginns wieder auf einen Wert von Q_{O_2} = 1,2 an. Erst um Z =

+ 10 h ist die Atmungsgröße wieder auf 0,85 gefallen. Gegen den erwarteten zweiten Morgen (Z = + 24 h) ist Q_{O_2} weiter gefallen bis auf etwa 0,5. liegt aber von Z = + 24 h bis Z = + 28 h wieder gesichert höher. Der Sauerstoffverbrauch erscheint also jeweils z. Zt. des erwarteten Tagbeginns, d. i. z. Zt. der Dunkelgametenmaxima, erhöht. Z. Zt. des erwarteten dritten Morgens (Z = + 48 h) ist Q_{O_2} noch 0,35, z. Zt. Z = + 84 h, d. h. 94 h nach dem Suspendieren im Dunkeln, noch 0,2. Von diesem Zeitpunkt ab wurden die Gefäße mit 500 erg/cm^2· sec weißem Licht einer Leuchtstofflampe vom Typ HNI belichtet. Das entspricht bei ungefähr 5 cm^2 Gefäßbodenfläche einer Energie von 2500 erg/sec. Die Atmungsgröße stieg dadurch innerhalb von 4 h auf Q_{O_2} = 0,7, also um ΔQ_{O_2} = 0,5. auf das 3,5-fache, fiel aber im Verlauf von weiteren 12 h trotz anhaltender Belichtung auf einen Wert von Q_{O_2} = 0,3 ab. Um Z = + 100 h wurde der Versuch abgebrochen, und die sexuelle Aktivität der ♂ mit voll aktiven ♀ im Agglutinationstest geprüft. Obwohl etwa 20 % der ♂ unbeweglich waren, zeigte sich sofort gute Gruppenbildung. Durch die 16-stündige Belichtung mit 500 erg/cm^2·sec Weißlicht sind die ♂ also teilweise wieder sexuell aktiviert worden. Berücksichtigt man, daß die verwendete Intensität relativ klein war (≈ 1/10 der Kulturintensität) und daß der CO_2-Partialdruck in der Atmosphäre äußerst gering war, so kann man die sexuelle Aktivierung nicht als eine Folge von Photosynthese interpretieren. Das ist auch dadurch ausgeschlossen, daß die Atmungsgröße mit Einsetzen der Belichtung zunächst über einige Stunden ansteigt (= Lichtatmungsreaktion oder photoinduzierte Oxydation*).

*Das Phänomen der Lichtatmungsreaktion haben wir (FÖRSTER und HARTMANN, unveröffentlicht) bereits im Sommer 1956 entdeckt; der Effekt trat aber nur gelegentlich auf, war überdies sehr klein und nur für einige Minuten vorhanden. Auch STIFTER[130] gelang es nicht, den Effekt reproduzierbar zu gestalten. Den Grund für die Mißerfolge kann man heute angeben. Bis zur ersten Tagmitte nach dem Suspendieren der Zellen ist die Atmung der Zellen gesättigt. In diesem Zeitbereich läßt sich die Atmung durch Licht praktisch nicht oder nur kurzzeitig aktivieren. Gerade in diesem Zeitraum wurde aber bislang hauptsächlich gearbeitet.

Da die Atmungsgröße aber dann wieder abfällt, wird man die sexuelle Aktivierung eher dahingehend interpretieren, daß durch die Belichtung eine bestimmte Art von Reservestoffen einer Veratmung erschlossen wird, daß der Pool dieser Reserven aber begrenzt ist.

Wenn die beobachtete Lichtatmungsreaktion durch Strahlungsabsorption in der Cytochromoxydase und eventuell der hellrotabsorbierenden Form des Phytochroms zustande kommt, so sollte man erwarten, daß gelbes Licht der Wirkung von weißem Licht überlegen ist. In einer zweiten Versuchsserie an ♂ (Abb. 53, $♂_2$) mit Sauerstoff im Gasraum wurde deshalb die Atmungsgröße über einige Tage verfolgt und von Z = + 48,0...+ 51,2 h ein Gefäß mit einem Lichtstrom $\bar{N}$ von 460 erg/sec = 0,30 mm^3 Quanten/min bei λ = 589 nm ein zweites mit dem zehnfachen Lichtstrom bestrahlt. Das dritte Gefäß wurde durchweg dunkel gehalten. Zunächst fällt auf, daß der Sauerstoffverbrauch bereits in den ersten 2 Stunden nach dem Suspendieren der Zellen seinen Höchstwert mit $Q_{O_2} \approx 1{,}75$ erreicht hat und daß der Abfall des Q_{O_2}-Wertes gegenüber dem ersten Versuch deutlich früher erfolgt. Der erhöhte Sauerstoffverbrauch im Bereich des ersten und zweiten erwarteten Belichtungsbeginns kommt nicht so gut zum Ausdruck wie im ersten Versuch. Diese Verzerrungen sind wohl eine Folge der reinen Sauerstoffatmosphäre, in der gegenüber Luft offenbar manche Oxydationsprozesse beschleunigt ablaufen. Trotzdem antworten die Zellen auch in der reinen Sauerstoffatmosphäre auf Belichtung mit λ = 589 nm mit einem starken Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und zwar ist mit 460 bzw. 4600 erg/sec im Verlaufe der 3-stündigen Belichtung Q_{O_2} von 0,45 auf 1,05 bzw. 1,15 angestiegen. Dies entspricht einem ΔQ_{O_2} von 0,6 bzw. 0,7 oder einem Anwachsen von Q_{O_2} aufs 2,3- bzw. 2,6-fache. Der durch Strahlung der Wellenlänge 589 nm erzielte Effekt ist dem von weißem Licht also gleichwertig. Daß durch die zehnfache Dosis nur eine geringfügige Mehrleistung erzielt worden ist, könnte daran liegen, daß die Lichtatmungsreaktion bereits mit 0,3 mm^3 Quanten/min gesättigt ist, es könnte aber auch eine logarithmische Abhängigkeit von der Intensität vorliegen. Ein sehr wichtiges Ergebnis ist, daß der

photoinduzierte Atmungsanstieg nicht mit dem Abschalten der Belichtung verschwindet, sondern mit einer Halbwertszeit von etwa 3 h gemäß einer Reaktion 1. Ordnung abklingt.

Zwei Versuche an ⊕ und ♀ lieferten prinzipiell ähnliche Ergebnisse wie ♂. Durch die Verwendung von Oktan als Manometerflüssigkeit ist die Genauigkeit der Messungen hier wesentlich verbessert. Der ab Z = - 11,7 h zuerst im palmelloiden Zustand gemessene Sauerstoffverbrauch fällt bis Z = - 9 h bei ⊕ von Q_{O_2} = 0,85 auf 0,5, bei ♀ von Q_{O_2} = 0,6 auf 0,4. Ob dieser Abfall durch das Abklingen der Lichtatmungsreaktion oder durch einen in reinem Sauerstoff kurzzeitig erhöhten Sauerstoffverbrauch bedingt ist, ist noch nicht untersucht. Auf jeden Fall steht fest, daß der Sauerstoffverbrauch in den ersten Stunden nach dem Suspendieren bis auf das 5-fache des Palmelloidwertes ansteigt und erst im Verlauf von zwei weiteren Tagen wieder auf den Palmelloidwert von Q_{O_2} = 0,5...0,4 abfällt. Hieraus folgt, daß der Energiebedarf der Zellen im palmelloiden Zustand bedeutend geringer ist als im Flagellastadium. Der starke Anstieg der Atmung in den ersten Stunden nach dem Suspendieren ist wahrscheinlich außer durch die Geißelbildung und das Beweglichwerden, die ja bereits nach 60 min abgeschlossen sind (s. III 1), durch Synthesen verursacht, die zum Mechanismus der Gametogenese gehören.

Im übrigen zeigt die Atmungsgröße von ⊕ einen Verlauf, der dem bei ♂ sehr gut entspricht. Der ab Z = - 6 h einsetzende Abfall der Atmungsgröße zeigt z. Zt. des erwarteten Belichtungsbeginns (Z = 0 h) einen kurzzeitigen Wiederanstieg der analog ♂ auch am zweiten erwarteten Morgen (Z = + 24 h) schwach in Erscheinung tritt. Die Atmungsgröße von ♀ zeigt ein in gewisser Hinsicht hiervon abweichendes Verhalten. Obwohl sich der Atmungsanstieg nach dem Suspendieren bis gegen Z = 0 h erstreckt, werden von ♀ die Spitzenwerte von ♂ oder ⊕ nicht erreicht. Im Bereich von Z = - 3...+ 40 h ist die Atmungsgröße von ♀ aber größer als die von ♂ oder ⊕. Der Unterschied ist am ausgeprägtesten im Bereich von Z = + 18...+ 22 h. Hier zeigen ♀ ein $Q_{O_2} \approx$ 0,85, wogegen ♂ und ⊕ nur Werte von 0,5...0,45 erreichen. Dies entspricht einem Verhältnis von $Q_{O_2♂}/Q_{O_2♀} \approx 0,6$, wie es auch von STIFTER[130] gefunden wurde. Trotz der höheren Atmung von ♀

ist auch hier, analog den Befunden bei ♂ und ⊕, z. Zt. des 1. und 2. erwarteten Belichtungsbeginns nach dem Suspendieren ein gegen den Grundtrend der abfallenden Atmung etwas erhöhter Sauerstoffverbrauch zu erkennen. Da ♂ und ⊕ in der Regel nur z. Zt. des erwarteten 1. und 2. Belichtungsbeginns nach dem Suspendieren im Dunkeln sexuell aktiv sind, ♀ aber nahezu den ganzen Tag über im Dunkeln sexuell aktiv bleiben, wird man sofort an eine Korrelation zwischen Atmungsgröße und sexueller Aktivität denken in der Art, daß höhere Atmung Voraussetzung für höhere sexuelle Aktivität ist.

Auf Belichtung mit 500 erg/cm^2·sec Weißlicht (HNI) ab Z = + 55,5 h ist bei ⊕ innerhalb von 1 h die Atmungsgröße von Q_{O_2} = 0,4 auf nur 0,6 also auf das 1,5-fache angestiegen, aber innerhalb der nächsten Stunde trotz andauernder Belichtung bereits wieder auf 0,5 abgefallen. Beim Parallelversuch mit ♀ ist die lichtinduzierte Atmung noch geringer. 1 h nach Belichtungsbeginn war Q_{O_2} von 0,4 auf 0,44, also aufs 1,1-fache angestiegen, aber bereits 2 h nach Belichtungsbeginn wieder auf 0,3 abgefallen. Im Bereich in dem die Atmungsgröße wieder auf den Palmelloidwert abgefallen ist (Z ≧ + 40 h), gilt also für die Größe der Lichtatmungsreaktion (= LAR) die Beziehung:

$$LAR_{♂} > LAR_{⊕} > LAR_{♀}$$

Dies ist ein Hinweis dafür, daß ♂ gewisse Substrate nur bei Belichtung in ausreichendem Maße veratmen können, wogegen ♀ offenbar diese Substrate auch im Dunkeln fast völlig aufbrauchen. ⊕ nimmt eine Zwischenstellung ein, die vielleicht durch ein von vornherein geringeres Substratpool bedingt ist. Wenn die sexuelle Aktivität der Zellen an die Veratmung dieser Substrate gebunden ist, so wäre damit das unterschiedliche sexuelle Verhalten der verschiedenen Klone erklärt und man würde für ⊕ auf Grund seines sexuellen Verhaltens für die Lichtatmungsreaktion Werte erwarten, die zwischen denen von ♂ und ♀ liegen. Es liegt die Vermutung nahe, daß die gleichen Substrate, die unt aeroben Bedingungen veratmet werden, unter anaeroben Bedingunge im Glykolysestoffwechsel in erhöhtem Maße umgesetzt werden. Es

ist dann verständlich, daß nach längerem Aufenthalt unter anaeroben Bedingungen die sexuelle Aktivität in Luft gehemmt erscheint (s. XX 2 b), weil der Substratpool anaerob schneller aufgebraucht wird.

XXIII. Die Lichtatmungsreaktion

Um zu klären, inwieweit die Lichtatmungsreaktion in ursächlichem Zusammenhang mit der sexuellen Aktivierung steht, bot sich die Möglichkeit, das Wirkungsspektrum der photoinduzierten Oxydation zu bestimmen. Dabei wurde die Möglichkeit, daß tagesperiodische Schwankungen des Wirkungsspektrums vorkommen können, berücksichtigt. Es wurde ferner beachtet, daß durch Belichten nur für einige Stunden eine Atmungserhöhung zu erzielen ist. Besonderes Augenmerk mußte außerdem auf die Eliminierung des störenden Einflusses der Photosynthese verwendet werden. Zunächst mußte aber eine günstige Maßzahl für den Effekt gefunden werden und die Frage untersucht werden, ob es für die Bestimmung der Größe der Lichtatmungsreaktion von Einfluß ist, ob sie in Luft oder Sauerstoff gemessen wird. Die Untersuchungen wurden hauptsächlich an ♀ durchgeführt, weil dieser Klon im vorangehenden Teil der Arbeit am besten untersucht worden ist.

1. Messung des Atmungsgrößenquotienten

Der Sauerstoffverbrauch wurde in manometrischer Anordnung in der in XII 3 h beschriebenen Anlage gemessen, wie in XII a angegeben, jedoch kamen als Manometriegefäße die neuerdings von WARBURG et al.[150] entwickelten rechteckigen Kastengefäße mit zentraler Wanne zur Anwendung. Diese Gefäße bieten neben der für die Absorptionsmessung notwendigen Voraussetzung, daß die ganze Bodenfläche von der Zellsuspension bedeckt ist den Vorteil, daß der Gasaustausch schneller erfolgt. Die zentrale Wanne und die Birne wurden mit je 0,2 cm^3 20 %igem KOH beschickt; im Hauptraum waren 4 cm^3 Zellsuspension mit 26...54 mm^3 Zellen. Im Gasraum war Luft bzw. Sauerstoff. Bei Gefäßvolumen von

17,26...17,99 cm^3 und Manometervolumen 1,39...1,58 cm^3 errechneten sich für die verwendeten Kombinationen mit Oktan als Manometersperrflüssigkeit für die Gefäßkonstanten Werte von k_{O_2} = 1,00...1,04. Die Absorption α_λ bzw. der Durchlaß d_λ für die verschiedenen Wellenlängen λ wurde an den fertig beschickten Gefäßen in der ULBRICHT'schen Kugel (s. XII 3 f) gemessen. Die Proben, an denen die Absorptionsmessungen durchgeführt wurden, konnten für die eigentlichen Versuche nicht mehr verwendet werden, da die Zellsuspensionen auf das Meßlicht in der Regel schon mit einer Atmungsänderung antworten. An Hand des gemessenen Durchlasses d_λ wurde der zu einer gewünschten mittleren Quantenstromdichte $\bar{N}$ bei der Wellenlänge λ gehörende Kompensationswiderstand ω nach Gleichung (48') berechnet und die Stufenlängen eingemessen. Der Sauerstoffverbrauch wurde zuerst über 1,5...5 h im Dunkeln verfolgt (= Δt) und anschließend über den gleichen Zeitraum bei Belichtung (= $\Delta t'$). Ein Kontrollgefäß wurde während der Gesamtzeit dunkel gehalten. In Abb. 54 ist ein Versuch mit σ wiedergegeben, bei dem im Bereich des 2. erwarteten Belichtungsbeginns (Z = + 24 h) 2,5 h lang mit einem mittleren Quantenstrom von $\bar{N}$ = 0,52 mm^3 Quanten/min bei λ = 589 nm bzw. 461 nm bestrahlt worden ist. Man erkennt, daß der Sauerstoffverbrauch in dem mit λ = 589 nm belichteten Gefäß während der Bestrahlung angestiegen ist. Nach Bestrahlungsende ist er wieder abgesunken. Auf blaue Strahlung der Wellenlänge 461 nm ist praktisch keine Änderung des Sauerstoffverbrauches erfolgt. Um aus solchen Versuchen eine geeignete Maßzahl für die Wirkung des Lichtes zu erhalten, bietet sich die Berechnung der Größe $Q^\lambda_{O_2}/Q^d_{O_2}$, also die Angabe, auf das wievielfache der Sauerstoffverbrauch während der Belichtung gegenüber dem Dunkelwert angehoben war, an. Um diese Größe an Hand der experimentellen Daten möglichst genau zu bestimmen, wurde wie folgt verfahren: Der in dem Zeitraum Δt gemessene Druckunterschied sei beim Kontrollgefäß = Δh_d, bei dem anschließend mit der Wellenlänge λ zu belichtenden Gefäß = Δh_λ gewesen. Während der Zeitspanne $\Delta t'$, in der die Belichtung durchgeführt worden war, seien die Druckunterschiede beim Kontrollgefäß = $\Delta h'_d$, bei dem mit der Wellenlänge λ belichteten Gefäß = $\Delta h'_\lambda$ gewesen. Dann ist der Atmungsgrößenquotient gegeben als:

$$Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d} = \frac{\Delta h'_{\lambda} \cdot \Delta h_d}{\Delta h_{\lambda} \cdot \Delta h'_d} \qquad (65)$$

Das methodisch wertvolle hierbei ist, daß in die Bestimmung von $Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$ die Gefäßkonstanten nicht eingehen. Durch Pipettierfehler bedingte unterschiedliche Beschickung der Gefäße wirkt sich ebenfalls nicht aus. Setzt man die Versuche so an, daß $\Delta t \approx \Delta t'$, d. h. $\Delta h_d \approx \Delta h'_d$, so wird bei Druckunterschieden von 50...100 mm Octan bei einer Ablesegenauigkeit von $\pm$ 0,5 mm der Quotient $Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$ mit einem mittleren Fehler von 2...1 % behaftet. Um die Wirkung des Lichtes als prozentuale Förderung oder Hemmung des Sauerstoffverbrauchs auszudrücken, wurde der Quotient $(Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d} - 1)/100$ verwendet.

2. Photoinduzierte Oxydation in Sauerstoff bzw. Luft

Bei einem Versuch an ⊕ mit einem mittleren Quantenstrom von $\bar{N}$ = 0,52 mm^3 Quanten/min bei λ = 589 nm und d_{589} = 0,58 im Bereich Z = + 22,5...+ 25,5 h durchgeführt, errechnete sich in Luft für $Q_{O_2}^{589}/Q_{O_2}^{d}$ = 1,240, in Sauerstoff $Q_{O_2}^{589}/Q_{O_2}^{d}$ = 1,236. Es ist also für die Lichtatmungsreaktion gleichgültig, ob sie in Luft oder Sauerstoff gemessen wird. Dementsprechend wurden kurzzeitige Versuche in der Regel in Luft durchgeführt, bei längeren Versuchen (>12 h) wurde in Sauerstoff gearbeitet, um eine Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes in der Atmosphäre auszuschließen.

3. Dosis-Effekt-Kurven des Atmungsgrößenquotienten bei variiertem Quantenstrom

Abb. 55 gibt Messungen des Atmungsgrößenquotienten wieder, die an ⊕ im Bereich Z = + 45...+ 50 h durchgeführt worden sind. Dabei ist mit einem mittleren Quantenstrom in der Suspension von $\bar{N}$ = 0,1...2 mm^3 Quanten/min bei λ = 589 nm belichtet worden. Im allgemeinen hat das Material auf ansteigenden Quantenstrom mit ansteigendem Sauerstoffverbrauch geantwortet. Davon abgesehen, daß der Effekt in seiner Größe streut, gibt es auch Fälle, in denen mit zunehmendem Quantenstrom eine Abnahme des

Sauerstoffverbrauches auftritt. Dieses Verhalten ist zu erwarten, wenn der Sauerstoffverbrauch der Zellen durch Belichten nicht mehr gesteigert werden kann, d. h. wenn sich der bei den Versuchsbedingungen (niederer CO_2-Partialdruck!) relativ geringe Photosyntheseeffekt bemerkbar macht.

Versuche an ⊕ z. Zt. des ersten Gametenminimums nach dem Suspendieren (Z = + 12,0...+ 14,5 h) durchgeführt (Abb. 56 a), zeigen eindeutig, daß sich die photoinduzierte Oxydation gegenüber der photosynthetischen Sauerstoffproduktion in verschiedenen Spektralbereichen verschieden stark durchsetzt. Während z. B. im gelben (λ = 589 nm) Spektralbereich mit anwachsendem Quantenstrom die oxydationsbeschleunigende Wirkung gegenüber der photosynthetischen Wirkung überwiegt, ist im roten (λ = 668 nm) das umgekehrte der Fall.

4. Das Wirkungsspektrum der Lichtatmungsreaktion

Für die Bestimmung des Wirkungsspektrums der photoinduzierten Oxydation war es notwendig, den Einfluß der Photosynthese zu eliminieren.

a) Methodik

Da die photosynthetische Sauerstoffproduktion der Quantenmenge proportional ist, die von den photosynthetisch aktiven Pigmenten, das sind hauptsächlich Chlorophyll a und b (s. EMERSON et al.[33]), absorbiert worden ist und der Quantenbedarf der Photosynthese im sichtbaren Spektralbezirken etwa gleich ist (s. WARBURG et al.[153] sowie EMERSON et al.[32]), kann man die Photosyntheseleistung für die verschiedenen Wellenlängen λ abschätzen, wenn: A) der Bruchteil der Energie der bei den verschiedenen Wellenlängen λ vom Chlorophyll a und b absorbiert wird, bekannt ist, und wenn: B) es gelingt, die photosynthetische Sauerstoffproduktion unter den hier verwendeten Spezialbedingungen bei einer Wellenlänge - ohne Verfälschung durch die photoinduzierte Oxydation - zu messen.

Zu A) Ausgehend von der Methode von WILLSTÄTTER et al.[158] zur Abtrennung von Karotin und Xantophyll von den übrigen Chloroplastenpigmenten wurden 100 mm^3 Θ-Zellen (30 d-Kultur, L:D = 14 h:10 h) 4 mal mit jeweils 5 cm^3 Methanol (p. a.) 2 min kräftig durchgeschüttelt und 2 min zentrifugiert bei 1500 g. Die Überstände (= Rohextrakt R) wurden vereinigt und enthalten praktisch alle wichtigen Farbstoffe des Versuchsobjektes. 10 cm^3 R wurden durch Zugabe von 5 cm^3 20 %igem KOH verseift und 2 min kräftig durchgeschüttelt. Der verseifte Rohextrakt wurde alsdann im Scheidetrichter mit 5 mal 10 cm^3 Petroläther (p. a.) ausgeschüttelt. Die Petrolätherauszüge wurden vereinigt, im Vakuum zur Trockene eingeengt und der Rückstand in 10 cm^3 Methanol gelöst (= Fraktion F). Zur Überprüfung der Trennung wurden in Anlehnung an die von BAUER[5] gegebene Methode (s. a. LINSKENS[89]) jeweils 0,4 cm^3 von R, F sowie dem ausgeschüttelten verseiften Rohextrakt (= av R) auf SCHLEICHER und SCHÜLL 2043 b punktförmig aufgetragen und 3 h in Argonatmosphäre im Dunkeln absteigend chromatographiert. R trennte sich in folgende Komponenten: Karotin rf = 1,0; Xantophyll rf = 0,75; Spur Xantophyllepoxyd rf = 0,5; Chlorophyll a rf = 0,25; Chlorophyll b rf = 0,17. Dagegen enthielt F lediglich Karotin und Xantophyll in gleicher Konzentration wie F. Aus av R ist erwartungsgemäß nichts ausgewandert.

Proben von R und F wurden mit Methanol 1:10 verdünnt und in einem BECKMAN Spektrophotometer Modell 2400 in 1 cm-Küvetten gegen Methanol photometriert. Das Ergebnis ist in Tab. 20 aufgetragen. Für jede Wellenlänge λ ist die Spaltbreite Sp angegeben, bei der die Extinktionen ε_R und ε_F bestimmt worden sind. Der Bruchteil der Strahlung, der durch die Chlorophylle absorbiert worden ist, ergibt sich dann zu $1 - \varepsilon_F / \varepsilon_R$. Das Ergebnis entspricht insofern nicht den Verhältnissen in vivo, als die Absorptionsbanden der Farbstoffe im extrahierten Zustand verändert sind. Das wird durch die Kurve in Abb. 49 demonstriert, die die Werte $\varepsilon_R^{\lambda} / \varepsilon_R^{433}$ als Funktion der Wellenlänge wiedergibt. Es ist jedoch zu beachten, daß das in vivo gemessene Absorptionsspektrum durch den Einfluß der wellenlängenabhängigen Streuung geringfügig verfälscht ist (s.

XV) und deshalb ebenfalls nicht die den wirklichen Farbstoffkonzentrationen entsprechenden Absorptionsverhältnisse wiedergibt.

Zu B) Um die photosynthetische Sauerstoffproduktion von Chlamydomonas ⊕ zu messen, ist der rote Spektralbereich (668 bzw. 681 nm) am besten geeignet, da hier im wesentlichen nur Chlorophyll a und b absorbieren (s. Tab. 20). Um die Wirkung der photoinduzierten Oxydation, die in diesem Spektralbereich relativ klein ist, abzuklammern, wurde der Sauerstoffverbrauch im Hell-Dunkel-Wechsel gemessen. Tab. 21 gibt einen Versuch wieder, der im Bereich Z = - 0,5...+ 1,7 h bei λ = 668 nm mit N_V = 2,18 mm^3 Quanten/min durchgeführt worden ist. Zur Bestimmung des Quantenbedarfs $1/\varphi$ der photosynthetischen Sauerstoffproduktion wurde der Sauerstoffverbrauch mehrerer Hellperioden ($= x^h_{O_2}$) zu dem der nachfolgenden gleichlangen Dunkelperioden ($= x^d_{O_2}$) in Beziehung gesetzt. Die ersten 5 min nach dem Abschalten der Belichtung wurden zur Messung nicht herangezogen. $1/\varphi$ berechnet sich dann nach

$$\frac{1}{\varphi} = \frac{N_v \cdot (1 - d_\lambda) \cdot (1 - \varepsilon_F/\varepsilon_R) \cdot \Delta t}{x^d_{O_2} - x^h_{O_2}} \qquad (66)$$

zu $\frac{1}{\varphi} = \frac{2{,}18 \cdot 0{,}90 \cdot 1 \cdot 45}{40{,}2 - 29{,}2} = \frac{88{,}4}{11{,}0} = 8{,}05$. Die Ergebnisse einiger Versuche, die zu verschiedenen Zeiten mit verschiedenen Quantenströmen an ⊕ durchgeführt worden sind, sind in Tab. 22 aufgeführt. Der Quantenbedarf für die photosynthetische Sauerstoffproduktion mit KOH im Einsatz liegt dabei unabhängig von der Zellzeit im Bereich $1/\varphi$ = 6,6...12,5, im Mittel bei $1/\varphi$ = 10,1 ± 1,2, sofern die absorbierte Energie klein bleibt und nur ein Bruchteil der Dunkelatmung kompensiert wird. Bei hohen Quantenströmen, die die Atmung fast kompensieren, steigt der Quantenbedarf der photosynthetischen Sauerstoffproduktion stark an. Dies ist zweifelsohne eine Folge des geringen Kohlendioxydpartialdruckes. Dieser ist dadurch bedingt, daß mit Kalilauge im Einsatz die Atmungs-Kohlensäure entfernt wird. Man erhält deshalb keine Kompensation der Atmung. Während unter Normalbedingungen die Photosyntheserate im Bereich von Null bis zur

mehrfachen Atmungskompensation als eine lineare Funktion der Lichtintensität angesehen werden darf (vgl. EMERSON et al.[31]), kann diese Abhängigkeit bei den hier herrschenden Bedingungen nur im Bereich von 0...30 % Atmungskompensierung angenommen werden. Unter diesen Bedingungen läßt sich also für C. moewusii ⊕ - in manometrischer Anordnung mit Kalilauge im Einsatz - die photosynthetische Sauerstoffproduktion bei der Wellenlänge λ angeben als:

$$x_{O_2}^{PS\lambda} \approx \frac{1}{10,1} \cdot N_v \cdot (1 - d_\lambda) \cdot (1 - \varepsilon_F/\varepsilon_R) \cdot \Delta t \ mm^3 \ O_2 \quad (67)$$

Ist die im Zeitraum Δt im Dunkeln verbrauchte Sauerstoffmenge $= x_{O_2}^d$ mm^3, so kann der nach Gleichung (65) bestimmte Atmungsgrößenquotient $Q_{O_2}^\lambda / Q_{O_2}^d$ bezüglich der Photosynthese korrigiert werden zu

$$Q_{O_2}^{PO} / Q_{O_2}^d = Q_{O_2}^\lambda / Q_{O_2}^d + x_{O_2}^{PS\lambda} / x_{O_2}^d . \quad (68)$$

Nach Einsetzen von (65) und (67) erhält man:

$$Q_{O_2}^{PO\lambda} / Q_{O_2}^d \approx \frac{\Delta h'_\lambda \cdot \Delta h_d}{\Delta h_\lambda \cdot \Delta h'_d} + \frac{N_v \cdot (1 - d_\lambda) \cdot (1 - \varepsilon_F/\varepsilon_R) \cdot \Delta t}{10,1 \cdot x_{O_2}^d} \quad (69)$$

Diese Gleichung gibt an, auf das Wievielfache die Atmungsgröße $Q_{O_2}^d$ bei Einstrahlung eines Quantenstromes N_v (in mm^3 Quanten/min) bei der Wellenlänge λ allein durch den Einfluß der photoinduzierten Oxydation (= PO) verändert wird.

Abb. 56 gibt die nach Gleichung (69) auf $Q_{O_2}^{PO} / Q_{O_2}^d$ umgerechneten Dosis-Effekt-Kurven der Abb. 56 a wieder. Der funktionelle Zusammenhang zwischen $Q_{O_2}^{PO\lambda} / Q_{O_2}^d$ und N_v kann für $N_v < 5$ mm^3 Quanten/min innerhalb der Fehlergrenzen zu

$$\left| Q_{O_2}^{PO\lambda} / Q_{O_2}^d - 1 \right| = a \cdot N_v + b \quad (70)$$

angenommen werden. Da für $N_v = 0$ auch $\left| Q_{O_2}^{PO\lambda} / Q_{O_2}^d - 1 \right| = 0$, ergibt sich für b = 0 und unter Berücksichtigung von Gleichung (47):

$$\left| Q_{O_2}^{PO\lambda} / Q_{O_2}^d - 1 \right| = a \cdot \frac{\log d_\lambda}{d_\lambda - 1} \cdot \bar{N} \quad (71)$$

Mittels der Beziehung (71) läßt sich angeben, der wievielfache (= m) mittlere Quantenstrom $\bar{N}$ bei der Bezugswellenlänge λ_o eingestrahlt werden müßte, um die gleiche Wirkung $\left|Q_{O_2}^{P\lambda}/Q_{O_2}^{d} - 1\right|$ zu erhalten, wie sie durch $\bar{N}$ bei der Wellenlänge λ hervorgerufen worden ist. Analog den Betrachtungen in XII 1 erhält man für das Wirkungsstärkenverhältnis der Wellenlängen λ und λ_o:

$$\frac{W_\lambda}{W_{\lambda o}} = m = \frac{m \cdot \bar{N}}{\bar{N}} = \frac{\left|Q_{O_2}^{P\lambda}/Q_{O_2}^{d} - 1\right|}{\left|Q_{O_2}^{P\lambda_o}/Q_{O_2}^{d} - 1\right|} \qquad (72)$$

Setzt man die Wirkungsstärke der Bezugswellenlänge $W_{\lambda o} = 1$, so ist die Wirkungsstärke der Wellenlänge λ gegeben durch:

$$W_\lambda = \frac{\left|Q_{O_2}^{P\lambda}/Q_{O_2}^{d} - 1\right|}{\left|Q_{O_2}^{P\lambda_o}/Q_{O_2}^{d} - 1\right|} \qquad (73)$$

Die Bestimmung des Wirkungsspektrums der photoinduzierten Oxydation lief also darauf hinaus, gleichzeitig an Proben des gleichen Materials den Sauerstoffverbrauch über mehrere Stunden im Dunkeln und bei Bestrahlung mit verschiedenen Wellenlängen zu messen. Dabei müßte der mittlere Quantenstrom $\bar{N}$ in der Suspension bei allen Wellenlängen der gleiche sein. Zur Wahl der Größe von $\bar{N}$ ist zu berücksichtigen, daß die in Abb. 56 b angegebenen Fehlerbereiche ($\pm\,\sigma$-Bereich) sich aus den Fehlern von $Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$ und den Fehlern von $x_{O_2}^{PS\lambda}/x_{O_2}^{d}$, die im wesentlichen aus dem Fehler von $1/\varphi$ ($s_r = \pm\,12\,\%$) bestehen, nach Gleichung (6) zusammensetzen. Da der Fehler von $1/\varphi$ sich etwa proportional der absorbierten Energie auswirkt, ist es zweckmäßig, mit Quantenströmen zu arbeiten, bei denen $\left|Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d} - 1\right|$ groß bleibt gegenüber $Q_{O_2}^{PS\lambda}/Q_{O_2}^{d}$. Aus diesem Grunde wurde bei mittleren Quantenströmen von $\bar{N} = 0{,}104 \ldots 0{,}52$ mm^3 Quanten/min gearbeitet.

b) Ergebnisse

Versuche an ♂

Abb. 54 stellt den Gesamtverlauf eines Versuches an ♂ dar. Die Berechnung der Atmungsgrößenquotienten nach Gleichung (65) ergibt Werte von

$Q_{O_2}^{589}/Q_{O_2}^{d} = 1{,}291 \pm 0{,}015$ bzw. $Q_{O_2}^{461}/Q_{O_2}^{d} = 1{,}023 \pm 0{,}012$.

Die zugehörigen Photosynthesekorrekturwerte ergeben sich, falls man auch bei ♂ mit $1/\varphi = 10{,}1$ rechnet, nach (67) zu:

$x_{O_2}^{PS589}/x_{O_2}^{d} = 0{,}046 \pm 0{,}006$ bzw. $x_{O_2}^{PS461}/x_{O_2}^{d} = 0{,}041 \pm 0{,}005$

und somit für die photoinduzierte Oxydation Werte von

$Q_{O_2}^{P0589}/Q_{O_2}^{d} = 1{,}337 \pm 0{,}016$ bzw. $Q_{O_2}^{P0461}/Q_{O_2}^{d} = 1{,}064 \pm 0{,}013$.

Mit $W_{589} = 1$ erhält man nach Gleichung (73) und bei Addition der relativen Fehler

$$W_{461\,♂} = \frac{0{,}064}{0{,}337} \pm \left(\frac{0{,}016}{0{,}337} + \frac{0{,}013}{0{,}064}\right) \cdot \frac{0{,}064}{0{,}337} = 0{,}19 \pm 0{,}05.$$

Die Ergebnisse dieses und einiger weiterer Versuche an ♂ sind in Tab. 23 zusammengestellt. Als Mittel aus 5 Messungen ergab sich bei $\lambda_o = 589$ nm und einem mittleren Quantenstrom $\bar{N} = 0{,}52$ mm^3 Quanten/min im Bereich Z =+23...+ 59 h für $Q_{O_2\,♂}^{P0589}/Q_{O_2}^{d} \pm s = 1{,}683 \pm 0{,}261$ d. h. eine Erhöhung der Atmung um 68 ± 26 %.

Versuche an ♀

Aus 10 Versuchen an ♀, die im Bereich Z = + 12,0...+ 14,5 h, also z. Zt. des 1. Gametenminimums, durchgeführt wurden, ergab sich bei 2,0...2,5-stündiger Belichtung mit $\lambda_o = 608$ nm und $\bar{N} = 0{,}104$ mm^3 Quanten/min für $Q_{O_2\,♀}^{P0608}/Q_{O_2}^{d} \pm s = 1{,}151 \pm 0{,}028$. d. h. eine Erhöhung der Atmung um 15,1 ± 2,8 %. Das aus diesen Versuchen berechnete vorläufige Wirkungsspektrum, bezogen auf $W_{608} = 1$ ist in Abb. 57 dargestellt. Entsprechende Versuche an ♀, im Bereich Z = + 45...+ 50 h,d. i. z. Zt. des 3. Gametenminimums, nach dem Suspendieren durchgeführt, ergaben als Mittel aus 28 Messungen bei 2,5...3,5-stündiger Belichtung mit $\lambda_o = 589$ nm und $\bar{N} = 0{,}208$ mm^3 Quanten/min für $Q_{O_2\,♀}^{P0589}/Q_{O_2}^{d} \pm s = 1{,}191 \pm 0{,}019$, d. h. eine Atmungserhöhung von 19,1 ± 1,9 %. Um das aus diesen Versuchen berechnete Wirkungsspektrum, bezogen au $W_{589} = 1$ mit dem Wirkungsspektrum z. Zt. des 1. Gametenminimums vergleichen zu können, ist folgende Überlegung notwendig: Im Bereich

Z = + 45...+ 50 h hatte sich für λ_o = 589 nm und $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min eine Atmungssteigerung von 19,1 % errechnet; für $\bar{N}$ = 0,104 mm^3 Quanten/min wäre daher nach (72) eine Atmungssteigerung von ≈ 9,6 % zu erwarten. Andererseits war im Bereich Z = + 12,0...+ 14,5 h bei λ_o = 608 nm und $\bar{N}$ = 0,104 mm^3 Quanten/min eine Atmungssteigerung von 15,1 % erzielt worden. Im Bereich Z = + 12,0...+ 14,5 h ist die Dunkelatmung von ♀ aber rund das 1,5-fache gegenüber dem Bereich Z = + 45...+ 50 h (vgl. Abb. 53). Der durch $\bar{N}$ = 0,104 mm^3 Quanten/min und λ_o = 589 nm im Bereich Z = + 45...+ 50 h erzielte Sauerstoffmehrverbrauch verhält sich also zu dem durch $\bar{N}$ = 0,104 mm^3 Quanten/min und λ_o = 608 nm im Bereich Z = + 12,0...+ 14,5 h erzielten wie m = 9,6/15,1·1,5 = 0,424. Das bedeutet, daß die im Bereich Z = + 45...+ 50 h mit W_{589} = 1 bestimmten Wirkungsstärken mit m = 0,424 durchmultipliziert werden müssen. Das so erhaltene Wirkungsspektrum ist ebenfalls in Abb. 57 eingezeichnet. Wenn vorerst auch nur einige Wirkungsstärken mit befriedigender Genauigkeit bestimmt sind, so zeichnet sich doch schon eine auffallende Parallele zu den Wirkungsspektren der sexuellen Aktivierung ab: Der hellrote Spektralbereich hat z. Zt. des 1. Gametenminimums stark fördernden Einfluß auf die sexuelle Aktivität wie auch auf die Atmung. Z. Zt. des 1. bzw. 3. Gametenmaximums dagegen wird sowohl die sexuelle Aktivität als auch die Atmung durch hellrote Strahlung - im Vergleich zu Gelb - nur unbedeutend gefördert. Bei den Wirkungsspektren der Lichtatmungsreaktion ist der Blaugipfel gegenüber dem Gelbgipfel offenbar nur schwach ausgeprägt (vgl. auch die Werte für ♂ aus Tab. 23). Auch der Gelbgipfel tritt bei dem z. Zt. des 1. Gametenminimums aufgenommenen Wirkungsspektrum der photoinduzierten Oxydation gegenüber der Förderung durch Hellrot sehr zurück. Es ist sogar so, daß auch bei dem z. Zt. des 3. Gametenmaximums aufgenommenen Wirkungsspektrum der photoinduzierten Oxydation eine relativ gute Hellrotwirkung erscheint. Die schlechte Förderung der Atmung durch den blauen und gelben Spektralbereich entspricht den Erwartungen. Denn wenn bereits bei den mit 30-minutigen Belichtungsphasen durchgeführten Versuchen zur Bestimmung der Wirkungsspektren der sexuellen Aktivierung das Zusammenbrechen der Blau- und Gelbwirkung beobachtet worden ist, so muß für die bei 2,5..

stündiger Bestrahlung gemessenen Wirkungsspektren der photoinduzierten Oxydation mit einer weiteren Verschlechterung der Blau- und Gelbwirkung relativ zur Hellrotwirkung gerechnet werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß sowohl die photoinduzierte Gametogenese wie auch die photoinduzierte Oxydation durch Strahlungsabsorption in den gleichen Pigmenten ausgelöst werden. Falls dies zutrifft, dann müßte sich analog der Kopulationshemmung durch Dunkelrot auch eine Atmungshemmung durch Dunkelrot nachweisen lassen. In den Wirkungsspektren der Abb. 57 deutet sich dies bereits an.

Die stärkste Hemmung der sexuellen Aktivität von ♀ durch Dunkelrot hatte sich nach Bestrahlung von Z = - 3 h ab ergeben (vgl. Abb. 42). Unter diesen Bedingungen erhält man auch eine starke Atmungshemmung (Abb. 58 und Abb. 59). Andererseits spricht die Atmung - in Übereinstimmung mit dem Wirkungsspektrum der Kopulationshemmung durch Störlicht (Abb. 46) - auf Belichtung mit Gelb (λ = 589 nm) zu dieser Zeit praktisch nicht an (s. Abb. 59). Bei den Versuchen dieser Art fiel auf, daß die Atmungshemmung in der Regel erst nach Belichtungszeiten von 30...60 min einsetzt. Zur Bestimmung von $Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$ wurde daher nicht über die gesamte Belichtungszeit integriert, sondern erst von 1 h nach Belichtungsbeginn ab. Als Mittel aus 9 Versuchen hatte sich bei Bestrahlung mit λ = 725 nm und $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min im Bereich Z =-3,0...+ 2,5 h für $Q_{O_2\,♀}^{P0725}/Q_{O_2}^{d}$ ± s = 0,892 ± 0,019 ergeben, d. h. eine Atmungshemmung von 10,8 ± 1,9 %. Die aus diesen Versuchen nach Gleichung (73) berechneten Wirkungsstärken, bezogen auf W_{725} = - 1 sind in Tab. 24 angegeben. Das Ergebnis spricht dafür, daß die Atmungshemmung durch Strahlungsabsorption in P_{DR} ausgelöst wird. Um die Wirkungsstärke aus Tab. 24 mit den Wirkungsspektren der Abb. 57 vergleichen zu können, muß man berücksichtigen, daß im Bereich Z = + 12,0... + 14,5 h durch $\bar{N}$ = 0,104 mm^3 Quanten/min bei λ = 608 nm eine Atmungsforderung von 15,1 % erzielt worden ist, demgegenüber ist durch die Bestrahlung im Bereich Z = - 3,0...+ 2,5 h durch $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min bei λ = 725 nm nur eine Atmungshemmung von 10,8 % erzielt worden. Da die Atmungsgrößen sich in diesen

zwei Bereichen wie 0,6/1 verhalten (s. Abb. 53), errechnet sich der Faktor m, mit dem die Wirkungsstärken der Tab. 24 multipliziert werden müssen, zu: m = 10,8/15,1 · 2 · 0,6 = 0,596. Die durch Umwandlung von P_{DR} in P_{HR} im Bereich Z = -3,0...+ 2,5 h zu erzielende Atmungshemmung ist also fast so groß wie die durch Umwandlung von P_{HR} in P_{DR} im Bereich Z = + 12,0...+ 14,5 h zu erzielende Atmungsförderung.

Bei einigen Versuchen zur Bestimmung der Wirkungsspektren der photoinduzierten Oxydation wurden die Zellen nach Versuchsende im Agglutinationstest (s. III 3) mit voll aktiven ♀ auf ihre sexuelle Aktivität geprüft. Bei den Versuchen im Bereich Z = - 3,0...+ 2,5 h zeigten die Dunkelkontrollen bei Versuchsende erwartungsgemäß gute Dunkelagglutinierfähigkeit. Die mit Dunkelrot bestrahlten Zellen waren dagegen sexuell inaktiv oder zumindest stark gehemmt. Proben aus den mit Blau oder Gelb bestrahlten Gefäßen erschienen bezüglich der Agglutinierfähigkeit nur geringfügig verschlechtert, wogegen bei den mit Hellrot bestrahlten Proben meist keine Änderung der sexuellen Aktivität zu beobachten war. Die durch die Bestrahlungen induzierten Unterschiede in der Agglutinationsstärke waren in der Regel nach 10-minutigem Aufenthalt im Lichtfeld des Binokulars (250 Lux HNI) verwischt, d. h. nach dieser Zeit war bei allen Proben maximale Agglutinierfähigkeit erreicht. Entsprechende Agglutinationsteste sind auch an Proben von Versuchen durchgeführt worden, die in den Bereichen Z = + 12,0...+ 14,5 h bzw. Z = + 45...+ 50 abgelaufen waren. Im ersten Fall zeigten die Dunkelkontrollen nach 5...10-minutigem Aufenthalt im Lichtfeld optimale Gruppenbildung. Ebenso reagierten die mit Dunkelrot bestrahlten Proben. Die mit Gelb oder Blau bestrahlten Proben blieben deutlich schlechter bzw. zeigten nur Ansätze zur Agglutination. Dagegen reagierten die mit Hellrot bestrahlten Proben besser als die Kontrollen. Im zweiten Fall zeigten die Dunkelkontrollen im allgemeinen erst nach rund 30-minutigem Aufenthalt im Lichtfeld starke Agglutination. Blau und Gelb bestrahlte Proben lieferten nur schwache Ansätze zur Agglutination und auch bei den mit Hellrot bestrahlten Proben war die Agglutinationsstärke geringer. Die mit Dunkelrot bestrahlten Proben dagegen reagierten besser als

die Dunkelkontrollen. Diese Befunde sind mit dem in XV diskutierten Syntheseschema (19'') gut zu vereinbaren. Auch die auf Bestrahlung mit Dunkelrot im Bereich Z = + 45...+ 50 h beobachtete Verbesserung der Reaktionsfähigkeit kann als Folge eines weitgehend aufgebrauchten Pools von Y zwanglos erklärt werden.

Versuche an ♀

Einige Versuche an ♀ (s. Tab. 25) haben ergeben, daß durch Einstrahlung von Dunkelrot im Bereich Z = - 4...+ 1 h keine Atmungshemmung induziert werden kann. Auch eine Atmungsförderung durch Hellrot oder Gelb scheint analog ♀ zu dieser Zeit nicht möglich zu sein. Dagegen läßt sich im Bereich Z = + 45...+ 50 h durch gelbe Strahlung (λ = 589 nm) die Atmung anheben. Als Mittel aus drei Messungen mit $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min ergab sich für $Q_{O_2}^{P0589}/Q_{O_2}^{d} \pm s$ = 1,096 ± 0,016. Die Wirkungsstärken bei 668 nm und 508 nm sind mit den Ergebnissen bei ♀ zu vereinbaren.

Es zeigt sich also bei ♀, bei denen die sexuelle Aktivität durch Strahlungsabsorption im Phytochrom relativ wenig beeinflußt wird (s. XII 5 und XV), auch bei der Lichtatmungsreaktion eine weitgehende Unabhängigkeit vom Phytochrom. Darüber hinaus führt die Anregung des Blau-Gelb-Pigments bei ♀ sowohl bezüglich der Steigerung der sexuellen Aktivität als auch bezüglich der Lichtatmungsreaktion nur zu einem Bruchteil der Reaktionssteigerung von ♀.

XXIV. Abschließende Betrachtungen

Die Untersuchungen über die tagesperiodischen Änderungen im Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung hatten zu der Vermutung geführt, daß die sexuelle Aktivität von reservestoffreichen Zellen von C. eugametos und C. moewusii außer über das Phytochrom und die HER (= Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem) durch Strahlungsabsorption in den reduzierten Cytochromen der

a-Gruppe entscheidend beeinflußt werden kann (s. XV). Diese Vermutung, wonach durch eine Regulierung des Durchsatzes in der Cytochromkette eine Regulierung der sexuellen Aktivität möglich sein müßte, ist durch die in XVI bis XXIII beschriebenen Untersuchungen weitgehend bestätigt und weiter spezifiziert worden.

Zunächst wurde gezeigt, daß der Ablauf von Gamonsynthese, Agglutination und Zellfusion sowohl bei Dunkelgameten wie auch bei lichtinduzierten Gameten durch einen Atmungsprozeß sehr begünstigt wird (XVI). Prinzipiell können diese Prozesse jedoch auch unter anaeroben Bedingungen ablaufen (XIX 2). An Hand von Versuchen mit Kohlenmonoxyd konnte der Nachweis geführt werden, daß der die Paarung begünstigende Atmungsprozeß durch Vermittlung eines "sauerstoffübertragenden Fermentes" mit Eisen als Wirkungsgruppe abläuft.(XVII, XVIII). Obwohl das Wirkungsspektrum für die Spaltung des Kohlenoxyd-Eisen-Komplexes des Fermentes noch nicht bestimmt worden ist, scheint es auf Grund der Lichtempfindlichkeit der Hemmung außer Zweifel, daß es sich bei dem fraglichen Ferment um das Cytochrom a_3 oder die Cytochromoxydase handelt. Bei den Untersuchungen hat sich ferner ergeben, daß durch Hemmung der Cytochromoxydase tagesperiodisch wechselnd verschieden große Paarungshemmungen erzielt werden. In den letzten Nachtstunden ist die Paarung gegen Hemmung der Cytochromoxydase relativ unempfindlich, wogegen bei Tagende durch Hemmung der Cytochromoxydase große Paarungshemmungen induziert werden (XVIII). Das bedeutet, daß in dem Synthesemechanismus der sexuellen Aktivität die Schrittmacherfunktion der Cytochromoxydase gegen Tagende am stärksten und gegen Nachtende am wenigsten ausgeprägt ist. Hiernach war zu erwarten, daß die sexuelle Aktivität besonders bei Tagende durch den Durchsatz in der Cytochromkette begrenzt wird, während gegen Morgen eine andere Komponente als dominierender Schrittmacher fungiert. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem Befund, daß im Bereich der Gametenmaxima ein Trend zu erhöhter Atmung zu erkennen ist (XXII). Einen weiteren Hinweis für die Parallelität zwischen sexueller Aktivität und Atmungsgröße liefert der Vergleich von ♂, ♀, und ♀:

♀, die über den Tagesverlauf bedeutend bessere sexuelle Aktivität zeigen als ♂ und ⊕, verbrauchen im Bereich der besseren sexuellen Aktivität bis zu 65 % mehr Sauerstoff (XXII). Daß die Parallelität zwischen sexueller Aktivität und Atmungsgröße vollkommen ist, konnte schließlich durch die Entdeckung der Lichtatmungsreaktion gezeigt werden (XXII, XXIII). Bei ♂ und ⊕ kann in ähnlicher Weise wie die sexuelle Aktivität auch der Sauerstoffverbrauch über das Phytochrom reguliert werden. ♀ dagegen sind bezüglich sexueller Aktivität und Atmung vom Phytochrom weitgehend unabhängig. Ein weiterer Photorezeptor, über den eine Aktivierung von Sexualität und Atmung möglich ist, ist das Blau-Gelb-Pigment. Es ist sehr wahrscheinlich, daß das Blau-Gelb-Pigment mit der Cytochromoxydase identisch ist. Dafür spricht außer dem Wirkungsspektrum die Tatsache, daß der Durchsatz in der Cytochromkette eine ausgeprägte Schrittmacherfunktion bezüglich der sexuellen Aktivität besitzt und daß in der Regel bei Pflanzenzellen das Cytochrom a + a_3 in relativ zu geringer Konzentration im Vergleich zu den übrigen Cytochromen vorkommt (s. JAMES et al.[67]). Nach spektrophotometrischen Untersuchungen von CHANCE et al.[20] an einer Chlorophyllmangelmutante von der mit C. eugametos und C. moewusii nahe verwandten C. reinhardti scheint dies auch für Chlamydomonas zuzutreffen. Unter diesen Umständen ist zu erwarten, daß durch Anregung der Cytochromoxydase eine Erhöhung der Wechselzahl dieses Fermentes und damit eine Beschleunigung des Elektronentransportes in der Cytochromkette zu erzielen ist.

Die bisher an ⊕ und ♂ vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die über Anregung der Cytochromoxydase zu erzielenden Steigerungen von Atmung und sexueller Aktivität in einem gewissen Abhängigkeitsverhältnis zum Phytochrom stehen (XV, XXIII). Es sieht so aus, als ob eine Anregung der Cytochromoxydase nur dann zur Aktivierung von Atmung und Sexualität führt, wenn eine durch P_{DR} gebildete Substanz V zur Verfügung steht. In diesem Zusammenhang sind auch die Befunde an ♀ von Interesse, denn ♀, die höhere Atmung und höhere sexuelle Aktivität zeigen als ♂ oder ⊕, sind vom Phytochrom weitgehend unabhängig. Die Bildung von V scheint also bei ♀ nicht durch das Phyto-

chrom kontrolliert zu werden. Das muß nicht heißen, daß in ♀ kein Phytochrom vorkommt. Es könnte nämlich im Gegenteil eine sehr hohe Konzentration davon vorliegen, sodaß das Phytochrom nicht als Schrittmacher für die Bildung von V in Erscheinung tritt. Damit steht in gutem Einklang, daß sich bei ♀, nachdem die Atmung auf die Werte von ♂ und ⊖ abgefallen ist, im Gegensatz zu ♂ und ⊖ sowohl die Atmung als auch die Gametogenese durch Licht nur schwach induzieren lassen. Die Erklärung ist einfach die, daß ♀ auf Grund der hohen Phytochromkonzentration ihren Pool von Y, der zur Bildung von V verwendet wird, schneller aufbrauchen als ♂ oder ⊖. - Bei einem zu kleinen Angebot von V bleibt die Anregung der Cytochromoxydase also generell ohne Auswirkung, d. h. die Atmungsgröße wird offenbar durch die Konzentration von V begrenzt.

Nun besteht daneben jedoch das Faktum, daß im Bereich des ersten Gametenmaximums, d. h. im Bereich maximaler Konzentration von V durch Anregung der Cytochromoxydase keine Atmungssteigerungen erzielt werden können, obwohl Steigerungen der sexuellen Aktivität unter Umständen noch möglich sind. Hierzu ist zu berücksichtigen, daß die Atmung, die über die Cytochromoxydase abläuft, vielleicht nur einen Bruchteil der Gesamtatmung von Chlamydomonas ausmacht. Es gibt verschiedene Punkte, die dafür sprechen: 1. scheint die Cytochromoxydase in relativ zu geringer Konzentration im Vergleich zu den übrigen Cytochromen vorzukommen (s. o.). 2. weisen die Berechnungen von XII 1 darauf hin, daß nur ein Bruchteil (= 84,7...92,5 %) der Synthese des Kontrollsubstrates X der Paarung kohlenmonoxydempfindlich ist. 3. hat sich bis zu einem CO/O_2-Verhältnis von 95/5 manometrisch keine Verringerung des Sauerstoffverbrauchs nachweisen lassen. Dieser Befund schließt jedoch nicht aus, daß die Atmung partiell kohlenmonoxydempfindlich ist. Es wäre nämlich denkbar, daß wie z. B. bei Seeigeln (s. ROTHSCHILD und BLACK et al.[10,11]) zwar eine Atmungshemmung durch Kohlenmonoxyd erzielt wird, daß diese aber durch gleichzeitig ablaufende Oxydation von CO zu CO_2 verdeckt wird. 4. wird die Atmung durch Blausäure nicht gehemmt, sondern im Gegenteil mit zunehmenden Cyanidkonzentrationen kurzzeitig sogar bis nahezu

aufs doppelte angehoben (s. Abb. 12, 13 und 60). Während sich aus der Nichthemmbarkeit der Zellatmung durch Blausäure keine Schlüsse ziehen lassen (s. WARBURG[143]), ist der Befund, daß der Sauerstoffverbrauch unter Einwirkung von Blausäure nahezu verdoppelt wird, ein Hinweis dafür, daß der größte Teil der Atmung über Bildung von Wasserstoffperoxyd (= H_2O_2) abläuft. Dieses wird normalerweise durch Katalasen zu H_2O und O_2 zerlegt. Unter Einwirkung von 10^{-3} mol Blausäure ist die Katalase jedoch so stark gehemmt, daß die Reaktion: $2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$ ausfällt, d. h. der Sauerstoffverbrauch der Atmung, die über Bildung von H_2O_2 abläuft, wird bei gleichzeitiger Anhäufung von H_2O_2 verdoppelt. Unter der Annahme, daß bei 10^{-3} mol KCN auch der Bruchteil n der Zellatmung, der über die Cytochromoxydase unter Bildung von H_2O abläuft, völlig gehemmt ist, läßt sich an Hand der Daten aus Abb. 60 abschätzen, wie groß n ist. Der Atmungsquotient ist unter Einwirkung von 10^{-3} mol KCN von $Q_{O_2} = 1{,}32$ auf $Q_{O_2} = 2{,}15$ emporgeschnellt. Der Wert $Q_{O_2} = 2{,}15$ repräsentiert demnach den doppelten Sauerstoffverbrauch der Atmung, die über Bildung von H_2O_2 abläuft. Es muß daher sein: $2{,}15/1{,}32 = 2\cdot(1 - n)/1$ oder $n = 18{,}5$ %. Dieses Ergebnis, wonach $\approx 81{,}5$ % der Zellatmung durch die wasserstoffperoxydbildende Atmung bestritten werden können, steht in auffallend guter Übereinstimmung mit der Berechnung aus XIX 1, welche zu dem Ergebnis geführt hatte, daß die Cytochromatmung bei der Paarung zu 84,7...92,5 % funktionell durch einen anderen Stoffwechselprozeß ersetzt werden kann. Daß die Atmungssteigerung durch Blausäure nur kurzzeitig in voller Größe bestehen bleibt, liegt wahrscheinlich daran, daß mit ansteigender Konzentration von H_2O_2 dieses mehr und mehr durch nicht blausäureempfindliche Peroxydasen gespalten wird. Dabei wäre z. B. auch mit einer beschleunigten Oxydation von Blausäure (= HCN) zu Cyansäure (= HCNO) zu rechnen, wobei letztere im neutralen wässrigen Milieu spontan in Ammoniak und Kohlendioxyd zerfallen müßte*.

*Diese Reaktion läuft bereits in einer zellfreien wässrigen Lösung von KCN nach Zugabe von H_2O_2 ab, wovon man sich an Hand des freiwerdenden Ammoniaks leicht überzeugen kann. Nachweis: ein mit NESSLER s Reagenz befeuchteter Glasstab wird über die Flüssigkeitsoberfläche gebracht.

Dadurch würde die Vergiftung von Cytochromoxydase und Katalase wieder beseitigt. Die entstandenen Ammoniumionen wiederum würden bei erhöhter Atmung von den Zellen assimiliert (VIII 3, 4). Da die Ammoniumassimilation zudem sehr empfindlich gegen Blausäure ist, wäre es unter diesen Umständen entsprechend Abb. 60 möglich, daß bei Anwendung relativ hoher Blausäurekonzentrationen diese sekundäre Atmungserhöhung sich nur partiell ausprägen kann, dafür aber bei Anhäufung von Ammoniumionen über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt. Bis jetzt vorliegende Befunde über Verlauf von Cyanid- und Ammoniumkonzentration sprechen dafür, daß dieses Geschehen in Blausäure vergifteten Chlamydomonaszellen tatsächlich abläuft (s. Abb. 61 und 62). Man gelangt also zu dem Ergebnis, daß in Chlamydomonas neben der normalen kohlenoxyd- und blausäureempfindlichen Atmung, bei der vom hydrierten Gelben Ferment (Wirkgruppe = Lactoflavinphosphorsäure oder Riboflavin) ausgehend 2 Elektronen über (Chinon, ?) Cytochrom b, Cytochrom c, Cytochrom a und Cytochromoxydase auf den Sauerstoff übertragen werden, d. h. bei der als Endprodukt H_2O gebildet wird, hauptsächlich ein zweiter nicht kohlenoxyd- und blausäureempfindlicher Weg beschritten wird, bei dem nur 1 Elektron auf den Sauerstoff übertragen wird, wobei also primär H_2O_2 entsteht, welches durch Katalase in H_2O und O_2 zerlegt wird. Es wäre z. B. möglich, daß sich dieser zweite Weg von der normalen Atmung nur dadurch unterscheidet, daß in den mitochondrialen Atmungsketten das Cytochrom a und die Cytochromoxydase fehlen bzw. durch eine nicht blausäure- und kohlenoxydempfindliche Endoxydase ersetzt sind. Eine weitere Möglichkeit wäre eine direkte Elektronenübertragung durch das Gelbe Ferment, wie sie bei gewissen Stämmen von Milchsäurebazillen vorkommt (s. WARBURG[145]). Unabhängig davon, welcher der Fälle realisiert ist, sind die ersten Schritte bei der wasser- bzw. wasserstoffperoxydbildenden Atmung identisch und es wäre denkbar, daß bei hohem Angebot von V auch bei Anregung der Cytochromoxydase keine Atmungssteigerung erzielt wird, weil die Gesamtgröße der Atmung durch die Aktivität eines der gemeinsamen Fermente (z. B. Dehydrasen, Gelbe Fermente) begrenzt wird. Daneben bliebe jedoch die Möglichkeit bestehen, daß durch Anregung

der Cytochromoxydase der Durchsatz in der wasserbildenden Atmungskette auf Kosten der wasserstoffperoxydbildenden erhöht wird und auf diese Weise eine Steigerung der sexuellen Aktivität erzielt wird. Die Bedeutung einer solchen Regulation für die sexuelle Aktivität läge wohl darin begründet, daß bei Verbrennung des Wasserstoffs auf dem Weg der normalen Atmung mehr Energie in Form von ATP abgefangen wird als auf dem Weg über H_2O_2. Eine Erhöhung des ATP-Angebots in der Zelle resultiert natürlich auch in den Fällen, in denen durch Anregung der Cytochromoxydase eine Erhöhung der Gesamtatmung erreicht wird. Man kommt somit zu der Vermutung, daß die Regulation der sexuellen Aktivität durch Anregung der Cytochromoxydase über Regulation des ATP-Angebots und damit der allgemeinen Syntheseleistung der Zelle erfolgt.

Es gibt verschiedene Befunde, die dafür sprechen, daß der Regulation des ATP-Angebots generelle Bedeutung bezüglich der sexuellen Aktivierung von Chlamydomonas zukommt. Bereits auf Grund der Ergebnisse über die Beeinflussung der sexuellen Aktivität durch Ammoniumionen (s. IX) ist gefolgert worden, daß die sexuelle Aktivität von Chlamydomonas durch Regulierung des $NADPH_2$- und ATP-Spiegels reguliert werden kann. Nach vorläufigen Untersuchungen hat sich außerdem ergeben, daß die Beweglichkeit der Zellen parallel zur sexuellen Aktivität tagesperiodisch schwankt. Da durch Untersuchungen von BROKAW[14,15] gezeigt worden ist, daß hauptsächlich ATP als Energielieferant für die Flagellenbewegung von Chlamydomonaden in Frage kommt, sind die Befunde über die Kinesernythmik ein wertvoller Hinweis für tagesperiodische Schwankungen des ATP-Angebots. Darüberhinaus ist sehr wichtig, daß in den Fällen, in denen durch sichtbare Strahlung eine Verbesserung der sexuellen Aktivität erzielt wird, auch eine Verbesserung der Beweglichkeit resultiert. Dagegen haben Bestrahlungen, die eine Hemmung der sexuellen Aktivität induzieren, auch eine Verschlechterung der Beweglichkeit zur Folge. Hiernach ist wahrscheinlich, daß über die gleichen Photorezeptoren, über die eine Regulation der sexuellen Akti-

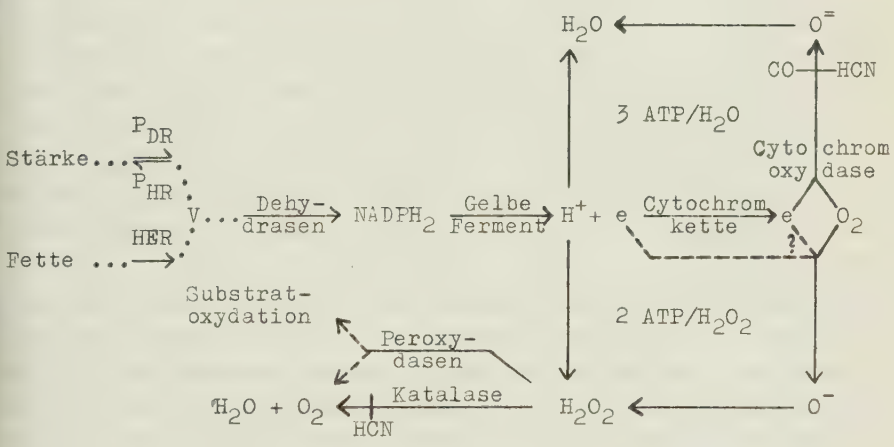
vität erfolgt, auch die Kinese gesteuert wird*. Dies ist eine weitere Stütze dafür, daß die beteiligten Photorezeptoren das ATP-Angebot regulieren. Schließlich ist noch bemerkenswert, daß auch bei rein anoxybiontischem Stoffwechsel in begrenztem Umfang Beweglichkeit, Gametogenese und Paarung erhalten bleiben. Nach den bisherigen Ergebnissen zu schließen (XIX 2, XX), liegt das daran, daß Chlamydomonas zum PASTEUR'effekt befähigt ist, d. h. unter anaeroben Bedingungen bei beschleunigter Glykolyse noch eine beträchtliche Menge an ATP bilden kann. Den Berechnungen aus XIX 2 zufolge reicht diese Menge, um noch 84...88 % der unter aeroben Bedingungen erhaltenen Konzentration des Kontrollsubstrates X der Paarung zu synthetisieren.

Es fragt sich nun, wie das Eingreifen des Phytochroms in einen solchen Regulationsmechanismus erklärt werden kann. Hierzu ist zu berücksichtigen, daß die über Anregung der Cytochromoxydase zu erzielende Regulation von Atmung, sexueller Aktivität und Beweglichkeit in einem gewissen Abhängigkeitsverhältnis zum Phytochrom steht (s. o.). Die nächstliegende Erklärung ist daher die Annahme, daß das Phytochrom etwas mit der Substratlieferung für die Atmungskette, d. h. mit der Reservestoffmobilisierung zu tun hat. Für die weitere Klärung dieser Sachlage scheint die Beobachtung wichtig, daß neben Photomorphosen, bei denen wie bei der Gametogenese von Chlamydomonas NER und HER synergistisch wirken, neuerdings Fälle bekannt geworden sind, bei denen NER und HER antagonistisch wirken (s. MOHR et al.[101], HENDRICKS et al.[60]). Da es sehr wahrscheinlich ist, daß durch die HER der Fettabbau aktiviert wird (s. XIV), würde man der Möglichkeit einer antagonistischen und synergistischen Wirkung von NER und HER am besten gerecht, wenn die NER entgegen der Ansicht von BORTHWICK et al.[13] den Abbau einer anderen Reser-

*In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß das von WOLKEN et al.[160] an Euglena gracilis ausgearbeitete Wirkungsspektrum der Photokinese mit Cytochromoxydase als wirksamem Photorezeptor zu vereinbaren ist.

vestoffklasse z. B. der Kohlehydrate (Stärke) kontrollieren würde. In diese Richtung deuten auch neuere Befunde von BERTSCH et al.[9], wonach durch Zucker induziertes Wachstum etiolierter Stengelabschnitte von Pisum über das Phytochrom beeinflußt werden kann. Bei Morphogenesen, bei denen es lediglich auf ein ausreichendes Angebot von "reducing power" ($NADH_2$, $NADPH_2$) und ATP ankäme, würden dann NER und HER synergistisch fördern, dagegen wäre für Morphogenesen, für die Fettsynthesen von Bedeutung sind, unter Umständen mit einer hemmenden Wirkung der HER zu rechnen.

An Hand der bisherigen Betrachtungen läßt sich ein vorläufiges Schema für den Regulationsmechanismus vom $NADPH_2$- und ATP-Spiegel bei Chlamydomonas entwerfen:



Die Interpretation dieses Schemas wird dadurch kompliziert, daß es unter dem Einfluß der endogenen Tagesrhythmik operiert (s. XV). Die Substrate (= V), die den ganzen Tag über einem Abbau im Intermediärstoffwechsel zugänglich sind, werden offenbar unter dem Einfluß der endogenen Tagesrhythmik hauptsächlich in der zweiten Nachthälfte aus den Reservestoffen (Stärke, Fette (= Y)) bereitgestellt. In den letzten Nachtstunden und ersten Tagstunden besteht daher ein ausreichendes Angebot an $NADPH_2$ und die Atmung

ist gesättigt, d. h. das Angebot von ATP ist groß. Bis gegen Tagende scheint der Pool an V soweit abzufallen, daß ein Abfall des $NADPH_2$-Spiegels auftritt und eine zunehmende Verringerung der Atmungsgröße in Erscheinung tritt. Dies bedeutet natürlich auch ein verringertes Angebot von ATP. Im Laufe der Nachtstunden steigt der Pool an V und damit das Angebot von $NADPH_2$ und ATP dann wieder an. - Daß solche tagesperiodischen Schwankungen im $NADPH_2$- und ATP-Angebot zahlreiche Prozesse tagesperiodisch beeinflussen könnten, steht außer Zweifel.

Nach den bis jetzt vorliegenden Erfahrungen ist bei reservestoffreichen Zellen ein Eingreifen in das Reaktionsschema über folgende Photorezeptoren möglich: Phytochrom (= P_{DR} und P_{HR}), Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem (HFR) und Cytochromoxydase*. Bei reservestoffarmen Zellen ist der dominierende Photorezeptor das Chlorophyll, denn bei solchen Zellen kann eine wirkungsvolle Anhebung des $NADPH_2$- und ATP-Spiegels natürlich nur über Photosynthese erfolgen. Als Folge der tagesperiodischen Substratlieferung für den Intermediärstoffwechsel und der daraus resultierenden Schwankungen im $NADPH_2$- und ATP-Spiegel würde verständlich, daß der Einfluß von sichtbarer Strahlung sich tagesperiodisch wechselnd über die verschiedenen Photorezeptoren verschieden stark auswirkt+.

---

*Ob gewisse Einflüsse (s. XIII 4) auf Strahlungsabsorption im Riboflavin (= Wirkgruppe der Gelben Fermente) zurückgeführt werden können, ist noch nicht geklärt. Es scheint aber durchaus möglich, daß durch Anregung vom Riboflavin die wasserstoffperoxydbildende Atmung beschleunigt wird (s. hierzu VERNON[138]). Auf diese Weise könnten vielleicht auch andere in der Literatur beschriebene Photomorphosen, bei denen der wirksame Photorezeptor Riboflavin zu sein scheint (s. z. B. EHRET[28], REICHARDT[116], Zusammenfassung bei MOHR[100]), funktionell erklärt werden.

+Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zu prüfen, ob das Reaktionsschema richtig ist. Versuche mit spezifischen Inhibitoren sind hierzu vielleicht von Wert. Letztlich wird man jedoch darauf bedacht sein müssen, die regulierten Komponenten zu messen.

Es ist klar, daß dieses Reaktionsschema, falls es sich als zutreffend herausstellen sollte, von allgemeiner Bedeutung ist. Z. B. könnte es bezüglich des Wirkungsmechanismus des Phytochroms wertvolle Aspekte liefern. Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt worden ist, daß das Phytochrom bereits auf der Evolutionsstufe der Flagellaten vorkommt, scheint zunächst die Basis für die universelle Verbreitung dieses photomorphogenetischen Reaktionssystems (s. MOHR[99], BAUER,et al.[6], HAUPT et al.[56], MITRAKOS[94]) erkannt. Darüber hinaus würde die Tatsache, daß das Phytochrom in die Reservestoffmobilisierung eingreift, verständlich machen, daß GORDON et al.[45] eine Beeinflussung der oxydativen Phosphorilierung durch das Phytochromsystem gefunden haben. Bei Gültigkeit des obigen Reaktionsschemas müßte dieser Einfluß jedoch verschwinden, sobald man die Substratzufuhr für die Atmungskette standardisiert, d. h. z. B. an isolierten Mitochondrien im definierten Medium arbeitet. Andererseits stehen auch die Ergebnisse von SISLER et al.[128], wonach durch das Hellrot-Dunkelrot-System der ATP-Spiegel nicht reguliert werden soll, nicht unbedingt in Widerspruch zu dem vermuteten Reaktionsschema. Auf Grund des Schemas wäre nämlich damit zu rechnen, daß Änderungen des $NADPH_2$- und ATP-Spiegels durch Hellrot- bzw. Dunkelrotbestrahlungen erst nach Aufbrauch des Substratpools V, d. h. unter Umständen erst nach mehreren Stunden in Erscheinung treten. Es wäre denkbar, daß solche Änderungen bei verschiedenen Objekten gemäß unterschiedlichem physiologischem Zustand und unterschiedlicher genetischer Konstitution ganz verschiedene Prozesse (Keimung, Wachstum, Blattbewegungen, Atmung, Blütenbildung bei Lang- und Kurztagpflanzen, Chloroplastendrehung, Anthocyanbildung, Chlorophyllbildung u. a.*) gleichsinnig oder gleiche Prozesse unterschiedlich (z. B. Atmungsgröße nach Blühinduktion bei Kurz- und Langtagpflanzen; s. ELLIOTT et al.[30], LEOPOLD et al.[81]) beeinflussen.

Zur Frage der Lokalisation der in dem Reaktionsschema erfaßten Photorezeptoren ist zu sagen, daß die an der Endoxydation betei-

*In diesem Rahmen wäre es wünschenswert zu prüfen, ob das Phytochrom nicht auch bei manchen Photosyntheseeffekten (s. RABINOWITCH et al.[113, 114]) eine Rolle spielt.

ligten Enzyme hauptsächlich in den Mitochondrien vorkommen (s. hierzu GREEN et al.[48]). Damit bleibt aber die Lokalisation des Phytochroms ungeklärt*. Ergebnisse von HAUPT[55] an Mougeotia sprechen vorläufig für eine Lokalisation in der wandständigen Cytoplasmaschicht.

Ein Phänomen kann an Hand des obigen Reaktionsschemas bislang nicht erklärt werden. Es ist die Tatsache, daß bei Chlamydomonas auf Bestrahlung mit Dunkelrot oder Orange in den ersten Nachtstunden nach dem Suspendieren eine Verbesserung der sexuellen Aktivität z. Zt. des erwarteten Tagbeginns resultiert (s. Abb. 42 und Abb. 45, sowie XIII 3 b). Dieser Effekt ist antagonistisch zu dem, der in der zweiten Nachthälfte erhalten wird. Ähnliche tagesperiodisch antagonistische Schwankungen der Lichtempfindlichkeit sind bei photoperiodisch kontrollierten Prozessen wiederholt beobachtet worden, so z. B. für Blüh- und Diapauseinduktion (s. hierzu BÜNNING[21, 22]). Diese Reaktionsweise tritt auf, wenn es für optimalen Ablauf des Gesamtprozesses notwendig ist, daß zwei Teilprozesse, die über unterschiedliche Pigmentsysteme beeinflußt werden können, zu unterschiedlichen Tageszeiten voll ausgesteuert werden müssen. Es liegt nahe, auch bei Chlamydomonas die antagonistischen Schwankungen der Lichtempfindlichkeit auf diese Weise zu interpretieren. Während einer der regulierten Teilprozesse offensichtlich in dem oben angegebenen Reaktionsschema erfaßt ist, kann man über einen anderen Teilprozeß vorerst nur richtungsweisende Angaben machen:

Einige orientierende Versuche haben zu dem Ergebnis geführt, daß bei 3 bis 4 Wochen alten Kulturen durch Bestrahlung mit Rotlicht (590...750 nm) in den ersten Nachtstunden nach dem Suspendieren eine Verbesserung der sexuellen Aktivität im Bereich des ersten Gametenmaximums erzielt wird. Dagegen reagieren die Zellen unte

*Richtungsweisend hierzu wären vielleicht Kreuzungsversuche zwischen Klonen, bei denen die Gametogenese in unterschiedlicher Weise vom Phytochrom abhängt (s. XIII 4, XV). Ob solche Unterschiede durch die Gene in den Chromosomen oder die genetisch selbständigen Strukturen im Plasma (Plasmon) oder den Plastiden (Plastom) bedingt werden, müßte sich damit zunächst entscheiden lassen.

den gleichen Bedingungen auf Bestrahlung mit Blaulicht (400... 500 nm) mit einer Verschlechterung der sexuellen Aktivität. Die Bestimmung des Wirkungsspektrums ist sehr erschwert, weil durch Bestrahlung in den ersten Nachtstunden auch Phasenverschiebungen der Rhythmik induziert werden (s. XIII 2) und deshalb 1-Punkt-Messungen zur Erfassung der Wirkung nicht ausreichen. Es hat sich aber gezeigt, daß Förderungen bzw. Hemmungen der Gametogenese durch Rot bzw. Blau auch in Erscheinung treten, wenn man die Bestrahlungen in die letzten Tagstunden vor dem Suspendieren verlegt, oder wenn man zur Anzucht Lampenstrahlung mit relativ hohem Rot- oder Blauanteil verwendet.* Es liegt nahe, diese Befunden mit den Ergebnissen von PIRSON et al.[111] an Chlorella pyrenoidosa in Zusammenhang zu bringen: Die Autoren haben an Wechsellichtkulturen nachgewiesen, daß nach Rotanzucht bei Einsetzen der Verdunkelung Zellen vorliegen, die vergleichsweise erheblich mehr Kohlehydrate enthalten als Zellen aus Blauanzucht. In der Dunkelzeit werden diese Unterschiede durch intensive Umwandlung von Kohlehydrat in organische N-Verbindungen dann weitgehend ausgeglichen. Das bedeutet, daß nachts der Aufbau von Protein und organischer phosphorhaltiger Substanz (s. a. LORENZEN et al.[91], MÜLLER[105]) bei Zellen aus Rotanzucht gegenüber Zellen aus Blauanzucht begünstigt wird. Unter diesem Gesichtspunkt könnte man auch die Begünstigung der Gametogenese von Chlamydomonas durch Rotbestrahlung in den Abendstunden verstehen, denn Proteinkomponenten sind mit Sicherheit am Aufbau der sexuellen Affinität be-

---

*Die Selektionsfaktoren für einen solchen Mechanismus dürften wohl die im natürlichen Tagesverlauf auftretenden Schwankungen in der spektralen Energieverteilung des Sonnenlichts sein (vgl. hierzu KLESCHNIN[72], Kap. 4, Sonnenstrahlung). Diesen Bedingungen kommt man am nächsten, wenn man nach der von WARBURG et al.[154] entwickelten Methode bei fluktuierenden Lichtintensitäten züchtet. Mit dieser Methode erhält man nicht nur eine gleichmäßige Zu- und Abnahme der Lichtintensität, sondern wie unter natürlichen Bedingungen auch eine Änderung der Spektralverteilung des Lichtes. Man sollte daher erwarten, daß diese Methode generell die Optimalbedingungen für die Anzucht von photoautotrophen Organismen liefert.

teiligt. So sind z. B. Träger der Agglutinationsreaktion, die an den Geißeln lokalisierten Gamone als Glykoproteide mit einem Molekulargewicht von $\approx 10^8$ erkannt worden (s. FÖRSTER et al.[42]). Es kann kein Zweifel darüber bestehen, daß zum Aufbau solcher Substanzen genetische Informationen verwertet werden. Diese werden aber, nach Erfahrungen an anderen Objekten zu schließen (s. z. B. JACOB et al.[65], PELLING[110]), von der DNS zunächst an die RNS und von dieser an die in den Mikrosomen synthetisierten Enzyme übergeben. Diese bestimmen letztlich die Strukturen und Prozesse in der Zelle. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die im Rahmen der Gametogenese von Chlamydomonas erfolgenden Enzymsynthesen mit dem starken Sauerstoffverbrauch in den ersten Stunden nach dem Suspendieren (s. Abb. 53 und S. 127) korreliert sind. Auf jeden Fall wird man damit rechnen müssen, daß die Rot- bzw. Blaubestrahlungen in den Abendstunden als Außenfaktoren über Beeinflussung des Zellstoffwechsels die zur Gametogenese notwendigen genetisch gelenkten Enzymsynthesen aktivieren oder inaktivieren können. Die durch diese Enzyme ermöglichten Synthesen, z. B. die Gamonsynthese, können offenbar über das oben skizzierte Reaktionsschema reguliert werden. Es ist natürlich denkbar, daß dadurch unter bestimmten Umständen Situationen oder Stoffe entstehen, die wiederum aktivierend oder inaktivierend auf weitere genetisch gelenkte Enzymsynthesen wirken. So muß man sich wohl prinzipiell die Steuerung von Entwicklungsprozessen vorstellen. Es entspräche dieser Erwartung, daß die Induktion von Entwicklungen durch Hemmung der RNS-Synthese gehemmt werden kann (s. z. B. die Befunde von SALISBURY et al.[124] und HESS[6] über Hemmung der Blüheinduktion durch 5-Fluoruracil bzw. 2-Thiouraci weil die für die Entwicklungen notwendigen genetischen Informatione auf dem Weg über die Synthese von spezifischer RNS (s. z. B. PELLING[110], HESS[61,62]) ins Cytoplasma wandern*. Man sollte jedoch stets im Auge behalten, daß mit dem Nachweis der Beteiligung von RNS-Synthesen an der Induktion von Entwicklungen das Problem der Induktion nicht gelöst ist. Denn dieses scheint doch primär in

*Daß in manchen Fällen der Nachweis noch nicht geglückt ist (s. z. B. EHRET[29]), dürfte seine Ursache in mangelnder Genauigkeit der Methode haben.

einer Wechselwirkung zwischen Cytoplasma und Genom zu bestehen, über deren Art vorerst nur Hinweise bekannt sind(s. IX; JACOB et al.[05]).

Manche einzellige Chlamydomonaden scheinen für die weitere Bearbeitung der hier aufgeworfenen Probleme günstige Objekte zu sein, denn sie werden bereits verschiedentlich erfolgreich zur Bearbeitung von genetischen Fragen herangezogen (GOWANS[46], LEVINE et al.[84], LEVINE[83], SAGER[121]). Es besteht somit die Chance, bei diesen Objekten auch an die genetischen Grundlagen der Gametogenese heranzukommen und letztlich diese Entwicklungsreaktion in ihrer Gesamtheit als Wechselspiel zwischen inneren und äußeren Bedingungen und spezifischer Struktur (= genetischer Konstitution) aufzuklären. Es wird sich empfehlen, die hierzu notwendigen biochemischen Analysen an Synchronkulturen durchzuführen. Das bedeutet aber, daß man in Zukunft von Agar- auf Flüssigkeitskultur übergehen muß. Damit erhebt sich zunächst die Frage, ob ausgehend von Flüssigkeitskulturen eine synchronisierte Auslösung der Gametogenese bei hohem Dunkelgametentiter möglich ist.* Im Hinblick auf Untersuchungen über die endogene Tages-

*Nach bis jetzt vorliegenden Versuchen wachsen C. eugametos und C. moewusii auch im flüssigen Medium bei erhöhter Salzkonzentration (0,5...1 % KNOP'sche Nährlösung) oder noch besser bei pH-Werten von 4,5...5,5 (0,1 % KNOP) palmelloid.(Spurenelemente kommen wie unter II 2 beschrieben zur Anwendung. Eine Dosierung der Spurenelemente durch Zugabe von Aethylendiamintetraessigsäure führt zur Entstehung von extrem großen Zellen und zu Schwierigkeiten bei der Auslösung der Gametogenese.) Bei Belichtung mit einigen tausend Lux, einem L:D-Wechsel von 14 h:10 h bis 18 h:6 h und laufender Frittendurchlüftung ("bubble tube") bei 20 °C kann dabei täglich Zellverdoppelung erzielt werden. Die unter diesen Bedingungen erhaltenen Zellen sind relativ klein und reservestoffarm und zeigen nach dem Suspendieren in S (s.VI) im Dunkeln keine sexuelle Aktivität. Wenn man die aus solchen Kulturen stammenden Zellen jedoch 1 bis 3 Tage in einem nahezu stickstofffreien Medium unter sonst gleichen Bedingungen nachinkubiert, so erhält man stärke- und ölreiche Zellen, die den aus 20 bis 30 Tage alten Agarkulturen stammenden sehr ähnlich sind

rhythmik wäre es sinnvoll, generell mit einer Chlamydomonade weiter zu arbeiten, die auch heterotroph ernährt werden kann.

Abschließend betrachtet, kommt man auf Grund des derzeitigen Standes der Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß die Gametogenese bei C. eugametos und C. moewusii ein Entwicklungsprozeß ist, der in seinen einzelnen Phasen durch die endogene Tagesrhythmik gesteuert wird. Dabei spielen Stoffwechselrhythmen eine entscheidende Rolle. Voraussetzung für den Ablauf der Gametogenese ist ein bestimmter physiologischer Zustand der Zelle. Sichtbare Strahlung kann über zahlreiche Photorezeptoren (Chlorophyll, Phytochrom, Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem, Cytochromoxydase, wahrscheinlich Riboflavin und ein weiteres, das Kohlehydrat-Eiweiß-Verhältnis beeinflussendes System) an ganz verschiedenen Stellen im Stoffwechsel zum Teil photoperiodisch regulierend in die Gametogenese eingreifen. Die Beeinflussung der Gametogenese von C. eugametos und C. moewusii durch Außenfaktoren erscheint demnach als ein ähnlich kompliziertes mit der endogenen Tagesrhythmik verquicktes Geschehen wie etwa die Blühinduktion. Ähnlich wie bei der Blühinduktion (s. ENGELMANN[3]) wird es zum Verständnis der funktionellen Wechselwirkungen in dem komplexverzahnten System notwendig sein, zunächst die beteiligten Einzelprozesse aufzuklären. Ob sich dabei, wie z. B. RAPER (zitiert nach LINSKENS[90]) glaubt, spezifische Stoffe finden lassen, die zwischen sexueller Aktivität und allgemeinem Stoffwechsel vermitteln, bleibt vorerst fraglich.

Meinen verehrten Lehrern, den Herren Professoren E. BÜNNING, H. MOHR, W. WEIDEL und Herrn Dozent W. HAUPT danke ich für anregende Diskussionen. Der Arbeitsplatz wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dr. W. WEIDEL zur Verfügung gestellt. Hierfür sei vielmals gedankt. Außerdem gebührt mein Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die Arbeit apparativ unterstützt hat, sowie Herrn Mechanikermeister H.-D. WOLF für die Ausführung technischer Details.

---

und dementsprechend nach dem Suspendieren in S auch eine Rhythmik in den Dunkelgameten zeigen. Diese Zellen sind natürlich auch zur Gamongewinnung bestens geeignet.

XXV. Zusammenfassung

Die diöcischen streng photoautotrophen Flagellaten Chlamydomonas eugametos (♂ und ♀) und C. moewusii (⊕ und ⊖) befinden sich nach 4-wöchiger Kultur auf KNOP-Agar in einem stärke- und ölreichen Zustand, in dem ausgehend vom Palmellastadium nach dem Suspendieren in Wasser nicht nur Begeißelung und Beweglichkeit, sondern auch Gamonsynthese, Agglutination (halbquantitativer Test) und Paarung (quantitativer Test) im Dunkeln ablaufen. Während bei ⊕ und ⊖ die Tendenz zur Dunkelagglutination und interlamellaren Speicherung von Stärke und Öl im Chloroplasten bereits nach 8-tägiger Kultur erscheint, tritt sie bei ♂ und ♀ erst nach 14-tägiger Kultur auf. Dabei erweisen sich ♀ als sexuell aktiver als ♂. Ein rassenspezifischer Unterschied zeigt sich außerdem in der Zellgröße: Nach 16-tägiger Kultur beträgt das Zellvolumen bei allen vier Klonen $\approx 360\ \mu^3$. Nach 4-wöchiger Kultur dagegen bei ♂ und ♀ $\approx 580\ \mu^3$, bei ⊕ und ⊖ $\approx 306\ \mu^3$.

Das pH-Optimum für den Ablauf von Agglutination und Paarung wurde bestimmt zu pH = 6,50...7,05 und eine entsprechende Suspendierlösung entwickelt.

Der quantitative Paarungstest genügt den Anforderungen eines proportionalen Testes, d. h. zum Ablauf von Paarungen müssen beide Kopulationspartner sexuell aktiv sein.

Die Beeinflussung der sexuellen Aktivität durch Ammoniumionen ist - im Gegensatz zur Agglutinations- und Paarungshemmung durch Cyanid - ein indirekter Effekt, der auf dem Weg über die cyanidempfindliche, im Intermediärstoffwechsel angreifende, mit starker Atmungserhöhung gekoppelte Ammoniumassimilation zustande kommt. Bei relativ jungen Kulturen (<25-tägig)treten nach Zugabe von $5 \cdot 10^{-5}$ mol NH_4^+ Hemmungen der sexuellen Aktivität auf, bei relativ alten Kulturen (>30-tägig) dagegen Förderungen. Dieses Verhalten weist darauf hin, daß zum Aufbau der sexuellen Aktivität ein ausbalancierter Zustand im Zellstoffwechsel notwendig ist, wobei ein bestimmtes Angebot an "reducing power", "energiereichen Phosphaten" und "einbaufähigem Stickstoff" bestehen muß.

Dosis-Effekt-Kurven für die sexuelle Aktivierung durch sichtbare Strahlung (weiß) erscheinen im sogenannten Wahrscheinlichkeitsnetz als Geraden. Bei 8-tägigen Kulturen liegt die Halbwertsdosis (= D 50 %) bei 500 lm·h/m^2 und das Wirkungsspektrum ähnelt dem der Photosynthese. Bei 25- bis 30-tägigen Kulturen dagegen liegt D 50 % bei nur 0,05 bis 1,0 lm·h/m^2 und weist somit auf die Beteiligung mehr katalytisch wirksamer Photorezeptoren.

Letztlich wird die sexuelle Aktivität durch ein "dynamisches" od "Fließgleichgewicht" bestimmt. Der Abbau erfolgt gemäß einer Reaktion 1. Ordnung. Die Geschwindigkeitskonstanten k dieser "Rückreaktion" liegen unabhängig von den Anzuchtbedingungen für 18 °C im Bereich: $0 \leq k_{♀} < k_{⊖} < k_{⊕} < k_{♂} = 1{,}8 \cdot 10^{-3}$ sec^{-1}. Die Aktivierungswärme für den Abbau beträgt bei ⊕ (bei ⊖ und ♂ ähnlich) 15,8 kcal, die Aktivierungswärme für den Abbau der isolierten ♂- bzw. ♀-Gamone demgegenüber 30 bzw. 20 kcal. Die Aktivierungsenergie für den Aufbau der sexuellen Aktivität liegt niedriger als die für den Abbau, für ⊕ z. B. bei 15,0 kcal. Das System zeigt also exothermen Charakter. Erst unter Einwirkung von Beleuchtungsstärken über 800 Lux wird der Charakter endother d. h. eine stärker temperaturabhängige Reaktion übernimmt unter diesen Umständen die Schrittmacherfunktion in der Synthesekette

Das Reizmengengesetz ist bei Anwendung weißer Strahlung erwartungsgemäß nicht erfüllt.

Nach Anzucht im Licht-Dunkel-Wechsel treten tagesrhythmische, s gedämpfte Schwankungen des Dunkelgametentiters auf. Die Aktivitä maxima fallen in den Bereich des erwarteten Belichtungsbeginns. Bei ♀ treten außerdem zwischengeschobene Nebenmaxima auf. Die Periodenlänge der frei oscillierenden Rhythmik beträgt weniger als 24 Stunden. Der Zeitpunkt des Suspendierens hat praktisch keinen Einfluß auf die Phasenlage der Rhythmik. Durch inversen Licht-Dunkel-Wechsel bei der Anzucht werden die Rhythmikphasen um 12 Stunden verschoben. Inverse Aktivitätsrhythmen überlagern sich ohne gegenseitige Beeinflussung, d. h. termonartige Wechsel wirkungen zwischen den Geschlechtern scheinen nicht zu bestehen Der Temperaturkoeffizient der Dunkelgametenrhythmik liegt bei $Q_{10} = 1{,}08$. 12-stündige Abkühlung von 20 °C auf 14 °C während der

ursprünglichen Tagesstunden führt zu Phasenverzögerungen der Rhythmik, 12-stündige Abkühlung während der ursprünglichen Nachtstunden eher zu geringfügiger Phasenverfrühung. Die energetische Spannungsphase des Oscillators fällt hiernach mit der Lichtphase, also mit dem Dunkelgametenabfall zusammen. 6-stündige Abkühlungen auf 4 °C liefern keine Phasenverschiebungen.

Nach Anzucht im Dauerlicht treten keine (bei ♂ beobachtet) oder nur schwach ausgeprägte (bei ♀ beobachtet) tagesrhythmische Schwankungen des Dunkelgametentiters auf. Dabei wirkt die Überführung vom Dauerlicht ins Dauerdunkel als Anstoß für die Rhythmik und fixiert die Phasenlage. Dem Suspendieren kommt die gleiche Funktion zu, jedoch weniger stark. Erfolgen Suspendieren und Überführung ins Dauerdunkel gleichzeitig, so wirken beide Faktoren antagonistisch, d. h. die Rhythmik ist schwach ausgeprägt; erfolgt die Überführung ins Dauerdunkel 12 Stunden vor dem Suspendieren, wirken beide Faktoren synergistisch, d. h. die Rhythmik erscheint stark ausgeprägt. Nach Dauerlicht-Kultur kann der Oscillator der Einzelzelle in Ruhelage sein oder schwach - eventuell nicht im 24-Stunden Rhythmus - schwingen und kann durch günstig liegende Dunkelstöße aufgeschaukelt werden. Dabei können neben den tagesperiodisch auftretenden Hauptmaxima noch Nebenmaxima erscheinen.

Nach Anzucht im Licht-Dunkel-Wechsel treten tagesperiodische Schwankungen in der Lichtaktivierbarkeit auf. Sie laufen den Schwankungen des Dunkelgametentiters weitgehend parallel; es können jedoch auch bei ♂ und ♀ - ähnlich wie beim Dunkelgametentiter von ♀ - Nebenmaxima auftreten.

Die vorstehenden Ergebnisse zeigen, daß die sexuelle Aktivität von C. eugametos und C. moewusii durch ein endodiurnales System gesteuert werden kann. Es wird eine Hypothese entwickelt, die das Auftreten der Nebenmaxima in der Weise erklärt, daß in der Synthesekette, die zum Aufbau der sexuellen Aktivität führt, zwei Übergänge liegen, bei denen die Durchflußgrößen endogen gesteuert, tagesperiodisch antagonistisch schwanken. Wenn weißes Licht an beiden Stellen fördernd eingreift, können Zwischengipfel auftreten, ohne daß man eine Beeinflussung der Energielagen des Oscillators postulieren muß. Hiernach ist zu erwarten, daß verschiedene Pigmente als wirksame Photorezeptoren operieren.

Unter Berücksichtigung der Absorption in der Zelle und der Kinetik der sexuellen Aktivierung werden grundsätzliche Betrachtungen zur Bestimmung von Wirkungsspektren angestellt. Die entwickelte Gleichung zur Bestimmung von Wirkungsspektren bei gleicher mittlerer Quantenstromdichte in der Suspension kann in all den Fällen verwendet werden, in denen ein in Form von relativen Häufigkeiten faßbares Merkmal bezüglich des Logarithmus der Dosis normal verteilt ist.

Vorversuche in offenen Küvetten bestätigen für 25±5-tägige Kulturen die von FORSTER[37,38] an ♂, ♀ und ⊖ ermittelten Wirkungsspektren der sexuellen Aktivierung weitgehend, liefern jedoch auch Hinweise für tagesperiodische Schwankungen im Wirkungsspektrum. Um diese Effekte zu sichern, wurde eine im Detail beschriebene dreistrahlige Interferenzfiltermonochromatoranlage für Versuche in manometrischer Anordnung verwendet. Die Strahlungsmessung erfolgte bolometrisch und ist ausführlich dargestellt. Die mittlere Intensität in der Zellsuspension wurde an Hand von Absorptionsmessungen mit der ULBRICHT'schen Kugel berechnet.

Dosis-Effekt-Kurven, aufgenommen an ♀, bei konstantem Quantenstrom und variierter Expositionszeit zeigen, daß durch gelbe oder weiße Strahlung induzierte Steigerungen der sexuellen Aktivität nach einem Reaktionsmechanismus 2. Ordnung erfolgen. Hemmungen durch Dunkelrot hingegen manifestieren sich nach einem Reaktionsmechanismus 0. Ordnung.

Dosis-Effekt-Kurven, aufgenommen an ♀ bei konstanter Expositionszeit und variiertem Quantenstrom im Bereich des Aktivitätsminimums erscheinen bei Wellenlängen von 400 bis 745 nm im Wahrscheinlichkeitsnetz als Geraden; im Bereich des Aktivitätsmaximums hingegen treten bei Wellenlängen von 400 bis 608 nm zunächst Förderungen auf, die bei höherer Dosis zu Hemmung umschlagen. Diese Hemmungen sind keine primären Hemmungen, denn sie kommen über vorhergehende Förderungen der sexuellen Aktivität zustande. Wellenlängen von 668 bis 744 nm dagegen liefern primäre Hemmungen von niederster Dosis an.

Das Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung für ♀, aufgenommen z. Zt. des Aktivitätsminimums zeigt einen Gipfel bei 580 nm (gegenen etwa gleich starken bei 625 nm(hellrot) und einen etwa

doppelt so hohen bei 460 nm (blau). Der dunkelrote Spektralbereich zeigt keine Wirkung. Das entsprechende Wirkungsspektrum, aufgenommen z. Zt. des Aktivitätsmaximums zeigt neben dem Gipfel bei 580 nm (gelb) nur einen kleinen Gipfel bei 460 nm (blau) und keinen im hellroten Spektralbereich.

♀ sind im Dunkeln stets etwas besser aktiv als ♁ und werden durch Licht weniger stark aktiviert als ♁. Außerdem wirkt bei ♀ z. Zt. des Aktivitätsminimums der hellrote Spektralbereich im Vergleich zum gelben nur wenig aktivierend.

Dunkelrot, 3 bis 2 Stunden vor dem erwarteten Tagbeginn gegeben, induziert bei ♁ starke Hemmungen der sexuellen Aktivität im Bereich des Aktivitätsmaximums (= Tagbeginn); 8 bis 4 Stunden vor oder erst z. Zt. des erwarteten Tagbeginns gegeben bleibt es ohne Wirkung; 10 bis 8 Stunden vor dem erwarteten Tagbeginn gegeben, werden Förderungen der sexuellen Aktivität induziert, die mit einer Phasenverschiebung der Aktivitätsrhythmik gekoppelt zu sein scheinen.

Die 3 bis 2 Stunden vor dem erwarteten Tagbeginn durch dunkelrotes Störlicht induzierten Hemmungen der sexuellen Aktivität sind der Expositionsdauer proportional. Bei Belichtungszeiten bis zu 15 min erscheint jedoch Förderung. Entsprechende, bei variiertem Quantenstrom erhaltene Dosis-Effekt-Kurven ähneln den im Bereich des Aktivitätsmaximums erhaltenen.

Das an ♁ bestimmte Störlichtwirkungsspektrum spricht - mit Ausnahme der Blauhemmung - für die dunkelrotabsorbierende Form des Phytochroms als wirksamen Photorezeptor. Dementsprechend können durch Dunkelrot induzierte Hemmungen durch anschließende Anregung der hellrotabsorbierenden Form des Phytochroms wieder weitgehend annulliert werden. Daneben bestehen Hinweise für die Existenz der Hochenergiereaktion (= Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem), die im vorliegenden Fall antagonistisch zum Phytochrom arbeitet. Außerdem zeigen die Zellen bezüglich der sexuellen Aktivität die Fähigkeit zur dynamischen Adaptation an hohe Lichtintensitäten.

Bei ♀ wird im Vergleich zu ♁ die sexuelle Aktivität durch Anregung des Phytochroms nur geringfügig beeinflußt.

Die tagesperiodischen Schwankungen im Wirkungsspektrum der sexuellen Aktivierung können unter Heranziehung von Versuchen mit Mischlicht so erklärt werden, daß der Hellrotgipfel des im Bereich des Aktivitätsminimums bestimmten Wirkungsspektrums auf Strahlungsabsorption in der hellrotabsorbierenden Form des Phytochroms zurückgeht. Daneben kommt einem Blau-Gelb-Pigment eine Schlüsselrolle bei der sexuellen Aktivierung zu. Sein Wirkungsort in der Synthesekette scheint hinter der des Phytochroms zu liegen. Das Wirkungsspektrum des "Blau-Gelb-Pigments" spricht für ein Cytochrom aus der a-Gruppe als wirksamen Photorezeptor. Damit erscheint es prüfenswert, ob durch Regulierung der Atmung eine Regulierung der sexuellen Aktivität möglich ist.

Anaerob ist nicht nur die Agglutination und die Paarung, sondern bereits die Gamonsynthese stark gehemmt. Hemmungen nach kurzzeitiger Anaerobiose sind voll reversibel, nach langzeitiger nicht mehr.

Versuche mit dem Paarungstest an ♀ und ♂ durchgeführt, bestätigen, daß die sexuelle Aktivität durch ein "dynamisches Gleichgewicht" bestimmt wird, bei dem die Synthese sowohl im Dunkeln als auch im Licht durch einen Atmungsprozeß günstig beeinflußt wird. Der beteiligte Atmungsprozeß ist bei einem Sauerstoffdruck von ≥ 1000 H_2O gesättigt. Die sexuelle Aktivität von ♀ ist in gleicher Weise vom Sauerstoffpartialdruck abhängig.

Die Paarung wird durch Kohlenmonoxyd gehemmt (geprüft an ♀, ♂ und ♀). ♀ erweisen sich gegenüber Kohlenoxyd empfindlicher als ♂ und Die hemmende Wirkung des Kohlenoxyds wird nicht durch den absoluten Kohlenoxydpartialdruck bestimmt, sondern durch das Verhältnis der Partialdrucke von Kohlenoxyd und Sauerstoff (geprüft an ♀ und ♂). Daraus folgt, daß am Ablauf der Paarung ein "sauerstoffübertragendes Ferment" beteiligt ist. Die Tatsache, daß die Hemmung der Paarung durch Kohlenmonoxyd lichtempfindlich ist (geprüft an ♀ und ♂), spricht für Eisen als Wirkungsgruppe des Ferments. Damit wird wahrscheinlich, daß die Cytochromoxydase als Schrittmacher in der Atmungskette die sexuelle Aktivität reguliert.

Die Paarung (geprüft an ♀ und ♂) ist bei Tagende gegen Kohlenoxyd etwa doppelt so empfindlich wie bei Tagbeginn, 6 Stunden vor Tagbeginn um einen Faktor 2 bis 3 unempfindlicher als bei Tagbeginn. Die Schrittmacherfunktion der Cytochromoxydase erscheint hiernach gegen Tagende am stärksten, in der zweiten Nachthälfte am wenigsten ausgeprägt.

Die Anwendung der Verteilungsgleichung liefert den Hinweis, daß die Cytochromatmung funktionell zu 84,5 bis 92,5 % durch einen anderen nicht kohlenoxydempfindlichen Stoffwechselprozeß ersetzt werden kann. Selbst in reinem Kohlenoxyd oder Argon können noch 84 bis 88 % des Kontrollsubstrates der Paarung synthetisiert werden, d. h. der anoxybiontische Stoffwechsel reicht in begrenztem Umfang zum Ablauf von Gamonsynthese, Agglutination und Paarung aus. Die sexuelle Aktivität läßt sich aber unter den hier gewählten Bedingungen durch Regulierung der Cytochromatmung nahezu vollkommen regulieren.

Der anoxybiontische Stoffwechsel ist dadurch ausgezeichnet, daß neben Kohlendioxyd (bei ♀ 0,48 bis 0,68 mm^3 CO_2/mm^3 Zellen·h) auch Wasserstoff (bei ♀ 0,17 bis 0,20 mm^3 H_2/mm^3 Zellen·h) gebildet wird. Als Endprodukt wird eine niederkettige Fett- oder Oxysäure in erhöhtem Maße ins Medium ausgeschieden. Diese kann auch unter aeroben Bedingungen nicht mehr resorbiert werden. Die Zelle erleidet anaerob also einen irreversiblen Energieverlust.

Die Funktion des Sauerstoffs bei der sexuellen Aktivität läßt sich durch Kaliumferricyanid oder Chinon als Elektronenacceptor nicht ersetzen.

In den ersten 6 Stunden nach dem Suspendieren erfolgt ein starker Anstieg der Atmung von $Q_{O_2} \approx 0{,}5 mm^3 O_2/mm^3$ Zellen·h auf $Q_{O_2} \approx 1{,}5$ mm^3 O_2/mm^3 Zellen·h. Der Energiebedarf der Zellen im Flagellastadium ist demnach bedeutend größer als im Palmellastadium.

Nach Anzucht im L:D-Wechsel ist bei ♀ und ♂ der Atmungsgrößenverlauf im DD sehr ähnlich: Etwa 6 Stunden vor dem erwarteten Tagbeginn setzt ein stetiger Abfall der Atmungsgröße ein. Er ist im Bereich des ersten und schwach auch im Bereich des zweiten Aktivitätsmaximums durch einen kurzzeitigen Wiederanstieg unterbrochen. Der Sauerstoffverbrauch der in der Regel besser sexuell aktiven ♀ ist

im Bereich des ersten bis dritten Aktivitätsmaximums größer als bei ♀ oder ♂. Im Bereich des zweiten Aktivitätsmaximums ist der Unterschied am größten und die Atmungsgrößen verhalten sich wie $Q_{O_2}♀/Q_{O_2}♂,♀ \approx 0{,}6$. Auch bei ♀ fällt im Bereich des 1. und 2. Aktivitätsmaximums ein etwas erhöhter Sauerstoffverbrauch auf.

Die Korrelation zwischen Atmungsgröße und sexueller Aktivität bestätigt sich weiterhin an Hand der Lichtatmungsreaktion. Bei . erfolgt in kohlendioxydfreier Atmosphäre im Bereich des 4. Aktivitätsminimums unter Einstrahlung von 2500 erg/sec weißen Licht in 4 Stunden ein Anstieg der Atmung von $Q_{O_2} \approx 0{,}2$ $mm^3 O_2/mm^3$ Zellen·h auf $Q_{O_2} \approx 0{,}7$ $mm^3 O_2/mm^3$ Zellen·h, also aufs 3,5-fache. Dabei werden die Zellen sexuell aktiv. Trotz anhaltender Bestrahlung fällt die Atmungsgröße in 12 Stunden wieder auf $Q_{O_2} \approx 0{,}3$ $mm^3 O_2/mm^3$ Zellen·h ab und die sexuelle Aktivität geht zurück. Unter vergleichbaren Bedingungen erhält man bei ♀ bzw. ♀ nur Steigerung der Atmung aufs 1,5- bzw. 1,1-fache. Dies ist ein Hinweis dafür, daß ♂ und in gewissem Maße auch ♀ manche in begrenztem Umfang vorhandene Reservestoffe, an deren Veratmung der Aufbau der sexuellen Aktivität gebunden ist, nur bei Bestrahlung in ausreichendem Maße veratmen können, wogegen ♀ diese Reserven auch im Dunkeln fast vollkommen aufbrauchen.

Messungen des Atmungsgrößenquotienten zwischen Dunkelheit und Bestrahlung ($= Q^{\lambda}_{O_2}/Q^{a}_{O_2}$) können zur Bestimmung von Wirkungsspektren herangezogen werden. Dabei ist es gleichgültig, ob in Sauerstoff oder Luft gemessen wird. Die Störwirkung der Photosynthese wurde entsprechend der wirksamen Strahlungsabsorption in den verschiedenen Spektralbereichen berücksichtigt. Unter den hier verwendeten Bedingungen hatte sich der Quantenbedarf der photosynthetischen Sauerstoffproduktion ergeben zu $1/\Psi = 10{,}1 \pm 1{,}2$.

Dosis-Effekt-Kurven der Lichtatmungsreaktion, bestimmt bei variiertem Quantenstrom an ♀, erlauben keinen Schluß auf den Reaktionsmechanismus.

Die an ♀ im Bereich des 1. Aktivitätsminimums bzw. 3. Aktivitätsmaximums bestimmten vorläufigen Wirkungsspektren der Lichtatmungsreaktion haben eine auffallende Ähnlichkeit mit den entsprechenden Wirkungsspektren der sexuellen Aktivierung. Analog der Hemm

der sexuellen Aktivität durch Anregung der dunkelrotabsorbierenden Form des Phytochroms in der zweiten Nachthälfte lassen sich bei ♀ und ♂ auch Atmungshemmungen erzielen. Sie sind fast so groß wie die im Bereich des 1. Aktivitätsminimums durch Anregung der hellrotabsorbierenden Form des Phytochroms zu erzielenden Atmungsförderungen.

Bei ♀ wird die Atmung - ähnlich der sexuellen Aktivität - durch Strahlungsabsorption im Phytochrom nur relativ wenig beeinflußt. Auch die Anregung des Blau-Gelb-Pigments liefert bei ♀ bezüglich der photoinduzierten Oxydation - ähnlich der sexuellen Aktivität - nur einen Bruchteil der Wirkung von ♀ und ♂. Diese Ergebnisse gestatten den Schluß, daß die photoinduzierte Gametogenese wie auch die photoinduzierte Oxydation durch Strahlungsabsorption in den gleichen Pigmenten ausgelöst wird.

Verschiedene Befunde weisen darauf hin, daß die Atmung, die über die Cytochromoxydase abläuft, nur einen Bruchteil der Zellatmung ausmacht: 1. kommt die Cytochromoxydase in relativ zu geringer Konzentration zu den übrigen Cytochromen in der Zelle vor. 2. ist nur ein Bruchteil der Paarung kohlenoxydempfindlich. 3. hat sich bis zu einem Verhältnis von CO/O_2= 95/5 keine Verringerung des Sauerstoffverbrauches nachweisen lassen. 4. steigt der Sauerstoffverbrauch der Zellen unter Einwirkung von $\approx 10^{-3}$ mol Cyanid nahezu aufs doppelte an. Dies führt zu der Vermutung, daß der größte Teil der Atmung über eine nicht kohlenoxyd- und cyanidempfindliche Endoxydase auf dem Weg über die Bildung von Wasserstoffperoxyd abläuft oder zumindest ersetzbar ist. Die Bedeutung dieses Mechanismus für die sexuelle Aktivität scheint darin zu liegen, daß bei der Wasserstoffoxydation auf dem Weg über die normale wasserbildende Atmung mehr Energie in Form von ATP abgefangen wird als auf dem Weg über die wasserstoffperoxydbildende Atmung. Es hat den Anschein, als ob bei der Regulierung der sexuellen Aktivität generell eine Regulierung des ATP-Angebots beteiligt ist. Hinweise hierfür ergeben sich nicht nur aus Versuchen mit Ammoniumionen, sondern auch daraus, daß eine Kineserhythmik parallel zur sexuellen Aktivitätsrhythmik besteht, denn ATP ist der Energielieferant für die Flagellenbewegung von Chlamydomonas. Ferner sind in

der Regel die durch Bestrahlung induzierten Forderungen oder Hemmungen der sexuellen Aktivität mit einer Förderung oder Hemmung der Beweglichkeit gekoppelt. Es ist somit wahrscheinlich, daß über die gleichen Photorezeptoren, über die die sexuelle Aktivität reguliert werden kann, auch die Kinese reguliert wird.

Die starke Abhängigkeit von Atmung, sexueller Aktivität und Beweglichkeit vom Phytochrom bei ♀ und ♂, sowie Ergebnisse an anderen Objekten legen die Vermutung nahe, daß das Phytochrom etwas mit der Substratlieferung für die Atmungskette, d. h. mit der Reservestoffmobilisierung zu tun hat. Die vergleichende Betrachtung der erarbeiteten Ergebnisse liefert ein vorläufiges Schema für den Regulationsmechanismus von Atmung, sexueller Aktivität und Beweglichkeit. Dabei erscheinen das $NADPH_2$- und ATP-Angebot als entscheidende Größen. Es bestehen außerdem Hinweise für einen weiteren eventuell das Kohlehydrat-Eiweiß-Verhältnis beeinflussenden Teilprozeß,der an der Regulierung der sexuellen Aktivität beteiligt ist.

XXVI. Literatur

1. AEBI, H.: in Biochemisches Taschenbuch, S. 680. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1956.
2. ALLEN, M. B.: Arch. Microbiol. 24: 163 (1956).
3. ARNON, D. I.: Amer. J. Bot. 25: 322 (1938).
4. BAKER, J. E.; THOMPSON, J. F.: Plant Physiol. 36: 208 (1961).
5. BAUER, L.: Naturwiss. 39: 88 (1952).
6. BAUER, L.; MOHR, H.: Planta 54: 68 (1959).
7. BERNSTEIN, E.; JAHN, L.: J. Protozool. 2: 81 (1955).
8. BERTALANFFY, L. v.: Theoretische Biologie, Bd. 2. Bern: 1951.
9. BERTSCH, W. F.; HILLMANN, W. S.: Amer. J. Bot. 48: 504 (1961).
10. BLACK, R. E.; TYLER, A.: Biol. Bull. 117: 443 (1959).
11. BLACK, R. E.; TYLER, A.: Biol. Bull. 117: 454 (1959).
12. BLADERGROEN, W.: Problems in Photosynthesis. Springfield: 196
13. BORTHWICK, H. A.; HENDRICKS, S. B.: Science 132: 1223 (1960).
14. BROKAW, C. J.: Exp. Cell. Res. 19: 430 (1960).
15. BROKAW, C. J.: Exp. Cell. Res. 22: 151 (1961).

16. BRUCE, V. G.; PITTENDRIGH, C. S.: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 42: 676 (1956).
17. BRUCE, V. G.; PITTENDRIGH, C. S.: J. cell. comp. Physiol. 56: 25 (1960).
18. BÜNNING, E.: Jb. wiss. Bot. 75: 439 (1931).
19. BÜNNING, E.: Ber. dt. bot. Ges. 53: 594 (1935).
20. BÜNNING, E.: Jb. wiss. Bot. 81: 411 (1935).
21. BÜNNING, E.: Die physiologische Uhr. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1958.
22. BÜNNING. E.: Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 25: 249 (1960).
23. BUFFALOE, N. D.: Bull. Torrey bot. Club 85: 157 (1958).
24. BUTLER, W. L.; NORRIS, K. H.; SIEGELMANN, H. W.; HENDRICKS, S. B.: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 45: 1703 (1959).
25. CHANCE, B.; SAGER, R.: Plant Physiol. 32: 548 (1957).
26. CROZIER, W. J.: J. gen. Physiol. 7: 189 (1924/1925).
27. D'ANS, J.; LAX, E.: Taschenbuch für Chemiker und Physiker. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1949.
28. EHRET, C. F.: Physiol. Zool. 26: 274 (1953).
29. EHRET, C. F.: Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 25: 149 (1960).
30. ELLIOTT, B. B.; LEOPOLD A. C.: Plant Physiol. 27: 787 (1952).
31. EMERSON, R.; CHALMERS, R. V.: in Research in Photosynthesis, S. 349. New York: 1957.
32. EMERSON, R.; LEWIS, C. M.: Amer. J. Bot. 30: 165 (1943).
33. EMERSON, R.; RABINOWITCH, E.: Plant Physiol. 35: 477 (1960).
34. ENGELMANN, W.: Planta 55: 496 (1960).
35. ETTL, H.: Arch. Prot. 105: 273 (1961).
36. FISCHER, E.: in Biochemisches Taschenbuch, S. 1176. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1956.
37. FÖRSTER, H.: Z. Naturforsch. 12 b: 765 (1957).
38. FÖRSTER, H.: Z. Naturforsch. 14 b: 479 (1959).
39. FÖRSTER, H.; WIESE, L.: Z. Naturforsch. 9 b: 470 (1954).
40. FÖRSTER, H.; WIESE, L.: Z. Naturforsch. 9 b: 548 (1954).
41. FÖRSTER, H.; WIESE, L.:Z. Naturforsch. 10 b: 91 (1955).
42. FÖRSTER, H.; WIESE, L.; BRAUNITZER, G.: Z. Naturforsch. 11 b: 315 (1956).
43. FRENKEL, A. W.: Arch. Biochem. Biophys. 38: 219 (1952).

44. GIBBS, S. P.; LEWIN, R. A.; PHILPOTT, D. E.: Exp. Cell. Res. 15: 619 (1958).
45. GORDON, S. A.; SURREY, K.: Radiation Res. 12: 325 (1960).
46. GOWANS, C. S.: Z. Vererb.-Lehre 91: 63 (1960).
47. GOWANS, C. S.: in X. International Congress of Genetics, Proceedings II, S. 100. Toronto: 1958.
48. GREEN, D. E.; HATEFI, Y.: Science 133: 13 (1961).
49. HAGEN-SEYFFERTH, M.: Planta 53: 376 (1959).
50. HARTMANN, K.: Bericht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft Ha 307/1 (1959).
51. HARTMANN, M.: Die Sexualität. Stuttgart: 1956.
52. HARTMANN, M.: Naturwiss. 43: 313 (1956).
53. HASTINGS, J. W.: Ann. Rev. Microbiol. 13: 297 (1959).
54. HAUPT, W.: Planta 53: 484 (1959).
55. HAUPT, W.: Planta 55: 465 (1960).
56. HAUPT, W.; THIELE, R.: Planta 56: 388 (1961).
57. HEITZ, E.: Z. Zellforsch. 53: 444 (1961).
58. HENDRICKS, S. B.; BORTHWICK, H. A.: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 45: 344 (1959).
59. HENDRICKS, S. B.; BORTHWICK, H. A.: Bot. Gaz. 120: 187 (1959)
60. HENDRICKS, S. B.; TOOLE, E. H.; TOOLE, V. K.; BORTHWICK, H. A. Bot. Gaz. 121: 1 (1959).
61. HESS, D.: Planta 57: 13 (1961).
62. HESS, D.: Planta 57: 29 (1961).
63. HOAGLAND, H.: Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 4: 267 (1936).
64. HOLZER, H.; WITT, J.: Biochim. Biophys. Acta 38: 163 (1960).
65. JACOB, F.; MONOD, J.: J. Molecular Biol. 3: 318 (1961).
66. JAMES, W. O.; LEECH, R. M.: Endeavour 19: 108 (1960).
67. JAMES, W. O.; RICHENS, A. M.: Nature (London) 188:423 (1960)
68. JOHNSON, F. H.; EYRING, H.; POLISSAR, M. J.: The Kinetic Basis of Molcular Biology. New York - London: 1954.
69. KANDELER, R.: Flora 149: 487 (1960).
70. KLEBS, G.: Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen. Jena: 1896.
71. KLEBS, G.: Biol. Zbl. 24: 257, 289, 449, 481, 545, 601 (1904)
72. KLESCHNIN, A. F.: Die Pflanze und das Licht. Berlin: 1960.
73. KÖHLER, K.: Arch. Prot. 101: 224 (1956).

74. KÖNITZ, W.: Planta 51: 1 (1958).
75. KOHLRAUSCH, F.: Praktische Physik, Bd. 1. Stuttgart: 1955.
76. KOLLER, S.: in Biochemisches Taschenbuch, S. 1184. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1956.
77. LATIMER, P.: Plant Physiol. 34: 193 (1959).
78. LATIMER, P.; BANNISTER, T. T.; RABINOWITCH, E. I.: in Research in Photosynthesis, S. 107. New York: 1957.
79. LATIMER, P.; RABINOWITCH, E.: in Research in Photosynthesis, S. 100. New York: 1957.
80. LATZKO, E.: Biochim. Biophys. Acta 47: 350 (1961).
81. LEOPOLD, A. C.; GUERNSEY, S.: Physiol. Plantarum 7: 30 (1954).
82. LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Berlin:1957.
83. LEVINE, R. P.: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46: 972 (1960).
84. LEVINE, R. P.; EBERSOLD, W. T.: Ann. Rev. Microbiol. 14: 197 (1960).
85. LEWIN, J. C.: Science 112: 652 (1950).
86. LEWIN, R. A.: Biol. Bull. 103: 74 (1952).
87. LEWIN, R. A.: J. gen. Microbiol. 15: 170 (1956).
88. LINDER, A.: Statistische Methoden. Basel - Stuttgart: 1960.
89. LINSKENS, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1959.
90. LINSKENS, H. F.: Fortschr. Bot. 22: 361 (1960).
91. LORENZEN, H.; RUPPEL, H.-G.: Planta 54: 394 (1960).
92. MATHER, K.: Statistische Analysen in der Biologie. Wien: 1946.
93. MIERDEL, G.: in Handwörterbuch der Naturwissenschaften 6: 356 (1932).
94. MITRAKOS, K.: Physiol. Plantarum 14: 497 (1961).
95. MOEWUS, F.: Z. Sexualforsch. 1:1 (1950).
96. MOHR, H.: Planta 46: 534 (1956).
97. MOHR, H.: Planta 49: 389 (1957).
98. MOHR, H.: Planta 53: 219 (1959).
99. MOHR, H.: Ergebn. Biol. 22: 67 (1960).
100. MOHR, H.: Ergebn. Biol. 23: 47 (1960).
101. MOHR, H.; NOBLE, A.: Planta 55: 327 (1960).
102. MOHR, H.; SCHOSER, G.: Planta 53: 1 (1959).
103. MOHR, H.; SCHOSER, G.: Planta 55: 143 (1960).
104. MOHR, H.; WEHRUNG, M.: Planta 55: 438 (1960).
105. MÜLLER, H.-M.: Planta 56: 555 (1961).
106. NEGELEIN, E.: in Biochemisches Taschenbuch, S. 997. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1956.

107. NETTER, H.: Theoretische Biochemie. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1959.
108. NYBOM, N.: Hereditas (Lund) 39: 317 (1953).
109. PÄTAU, K.: Biol. Zbl. 63: 152 (1943).
110. PELLING, C.: Nature (London) 184: 655 (1959).
111. PIRSON, A.; KOWALLIK, W.: Naturwiss. 47: 476 (1960).
112. PRECHT,; CHRISTOPHERSEN, J.; HEUSEL, H.: Temperatur und Leben. Berlin - Göttingen - Heidelberg: 1955.
113. RABINOWITCH, E.; GOVINDJEE, R.; THOMAS, J. B.: Science 132: 433 (1960).
114. RABINOWITCH, E.; THOMAS, J. B.; GOVINDJEE, R.: Science 132: 421 (1960).
115. RAWSON, K. S.: Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 25:: 105 (1960).
116. REICHARDT, W.: Naturwiss. 48: 192 (1961).
117. ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, München: 1948.
118. RONKIN, R. R.; BURETZ, K. M.: J. Protozool. 7: 109 (1960).
119. ROTHSCHILD, L.: J. Exp. Biol. 26: 100 (1949).
120. RUDDAT, M.: Z. Bot. 49: 23 (1961).
121. SAGER, R.: Science 132: 1459 (1960).
122. SAGER, R.; GRANICK, S.: J. gen. Physiol. 37: 729 (1954).
123. SAGER, R.; PALADE, G. E.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 3: 463 (1957).
124. SALISBURY, F. B.; BONNER, J.: Plant Physiol. 35: 173 (1960).
125. SIEGELMANN, H. W.; HENDRICKS, S. B.: Plant Physiol. 32: 393 (1957).
126. SIEGELMANN, H. W.; HENDRICKS, S. B.: Plant Physiol. (Suppl.) 32: 9 (1957).
127. SIEGELMANN, H. W.; HENDRICKS, S. B.: Plant Physiol. 33: 185 (1958).
128. SISLER, E. C.; KLEIN, W. H.: Plant Physiol. (Suppl.) 35: 32 (1960).
129. STARR, R. C.: Amer. J. Bot. 47: 67 (1960).
130. STIFTER, I.: Arch. Prot. 104: 364 (1959).
131. SWEENEY, B. M.; HASTINGS, J. W.: J. Protozool. 5: 217 (1958).
132. SWEENEY, B. M.; HASTINGS, J. W.: Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 25: 87 (1960).

133. SYRETT, P. J.: Arch. Biochem. Biophys. 75: 117 (1958).
134. TIMOFEEFF-RESSOVSKY, N. W.; ZIMMER, K. G.: Biophysik Bd. I, Das Trefferprinzip in der Biologie. Leipzig: 1947.
135. TRAINOR, F. R.: Amer. J. Bot. 46: 65 (1959).
136. TSUBO, Y.: Bot. Mag. (Tokyo) 69: 1 (1956).
137. TSUBO, Y.: J. Protozool. 8: 114 (1961).
138. VERNON, L. P.: Biochim. Biophys. Acta 36: 177 (1959).
139. WARBURG, E.: Z. Elektrochemie 27: 135 (1921).
140. WARBURG, E.; LEITHÄUSER, G.; HUPKA, E.; MÜLLER, C.: Ann. Physik 40: 609 (1913).
141. WARBURG, E.; MÜLLER, C.: Verh. dt. physik. Ges. 18: 245 (1916).
142. WARBURG, O.: Biochem. Z. 166: 386 (1925).
143. WARBURG, O.: Biochem. Z. 231: 493 (1931).
144. WARBURG, O.: in Naturforschung und Medizin in Deutschland 1939-46, Bd. 39, I: 201. Wiesbaden: 1947.
145. WARBURG, O.: Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin: 1948.
146. WARBURG, O.: Biochim. Biophys. Acta 12: 356 (1953).
147. WARBURG, O.: Biochim. Biophys. Acta. 18: 163 (1955).
148. WARBURG, O.; KRIPPAHL, G.: Z. Naturforsch. 9 b: 181 (1954).
149. WARBURG, O.; KRIPPAHL, G.: Z. Naturforsch. 13 b: 66 (1958).
150. WARBURG, O.; KRIPPAHL, G.: Z. Naturforsch. 13 b: 434 (1958).
151. WARBURG, O.; KRIPPAHL, G.; BUCHHOLZ, W.; SCHRÖDER, W.: Z. Naturforsch. 8 b: 675 (1953).
152. WARBURG, O.; KRIPPAHL, G.; SCHRÖDER, W.: Z. Naturforsch. 10 b: 631 (1955).
153. WARBURG, O.; NEGELEIN, E.: Z. physik. Chemie 106: 191 (1923).
154. WARBURG, O.; SCHRÖDER, W.; GATTUNG, H. W.: Z. Naturforsch. 11 b: 654 (1956).
155. WASSERMANN, L.: Planta 53: 647 (1959).
156. WETHERELL, D. F.: Physiol. Plantarum 11: 260 (1958).
157. WIESE, L.: Fortschr. Zool. 13: 119 (1961).
158. WILLSTÄTTER, R.; STOLL, A.: Untersuchungen über das Chlorophyll. Berlin: 1913.
159. WITHROW, R. B.; KLEIN, W. H.; ELSTAD, V.: Plant Physiol. 32: 453 (1957).
160. WOLKEN, J. J.; SHIN, E.: J. Protozool. 5: 39 (1958).
161. ZUPPINGER, A.: Strahlenther. 28: 639 (1928).

XXVII. Tabellen

Tab. 1. Kreuzung der 4 Klone und Stärke der beobachteten Dunkelagglutination als Funktion des Kulturalters. Reaktionsstärken gemäß den Angaben in III 3.

30^{d}	♂	⊕	♀	⊖
♂	0	0	2-3	2-3
⊕	0	0	2-3	2-3
♀	2-3	2-3	0	0
⊖	2-3	2-3	0	0

8^{d}	♂	⊕
♀	0	0
⊖	0	1-2

16^{d}	♂	⊕
♀	0-1	1-2
⊖	0-1	2-3

Tab. 2. Änderung der Zellgröße mit dem Kulturalter. Angegeben ist das Zellvolumen v in μ^3 mit seinem mittleren Fehler $\pm \sigma$.

v	16 d	28 d
♂	374 ± 21	577 ± 33
♀	364 ± 22	
⊕	361 ± 27	306 ± 22
⊖	352 ± 16	

Tab. 4. Einfluß der Temperatur auf den Gametentiter.

♂: V = 4,0; w = $0{,}8 \cdot 10^{-3}$. Testklon: ♀, V = 1,0; w = $6{,}5 \cdot 10^{-3}$.

°C	15	20	24
G_d/G_p	0,53	0,37	0,18
Probit G_d/G_p	5,05	4,65	4,10
G_p	-	0,87	-

⊕: V= 3,0; w = $(0{,}6 \ldots 0{,}7) \cdot 10^{-3}$. Testklon: ♀, V = 0,5; w = $(7 \ldots 16) \cdot 10^{-3}$.

°C	14,5	20,0	23,0
*Probit $G_d/G_p \pm s$	5,56 ± 0,11	4,89 ± 0,08	4,09 ± 0,07
G_p	-	0,75...0,87	-
$k_⊕$ (nach Abb.19)	$3{,}02 \cdot 10^{-4}$	$5{,}01 \cdot 10^{-4}$	$6{,}61 \cdot 10^{-4}$
1/T	$3{,}4785 \cdot 10^{-3}$	$3{,}413 \cdot 10^{-3}$	$3{,}378 \cdot 10^{-3}$
$G_p \pm \sigma$	0,737 ± 0,017	0,782 ± 0,019	0,830 ± 0,021

*Mittel aus 4 Versuchen

Tab. 3. G-Werte bei variiertem f.

Versuch 1: Dunkel, $w_{\oplus} = 0{,}5 \cdot 10^{-3}$, $w_{\varphi} = 9 \cdot 10^{-3}$, pH = 6,9.

$V_{\oplus}$	V_{φ}	f	$G_{\oplus} \pm \sigma$
2,0	0,5	2,39	0,195 ± 0,015
1,0	0,5	4,77	0,175 ± 0,014
0,5	0,5	9,54	0,156 ± 0,021
0,25	0,5	19,1	0,189 ± 0,031

Versuch 2: 1100 Lux, $w_{\oplus} = 4 \cdot 10^{-3}$, $w_{\varphi} = 6{,}5 \cdot 10^{-3}$, pH = 7,1.

$V_{\oplus}$	V_{φ}	f	$G_{\oplus} \pm \sigma$
0,5	1,0	1,72	0,803 ± 0,04
0,15	1,0	5,74	0,839 ± 0,06
0,05	1,0	17,2	0,741 ± 0,09

Tab. 5. Die verwendeten Filterkombinationen. Alle Daten nach den Angaben des Herstellers, Fa. SCHOTT u. Gen. Mainz. λ_{max}: Wellenlänge der maximalen Durchlässigkeit. T_{max}: Transmissionsgrad bei λ_{max}. HW: Halbwertsbreite, d. h. Durchlaßbereich für $T > T_{max}/2$.

λ_{max} der Filterkombination in nm	Farbgläser: Glasart (Dicke in mm)	Interferenzfilter: Typ, λ_{m} in nm (T_{max} in %/HW in n
400	UG 3(4)	IL 400(34/19)
433	BG 25(2)	IL 433(30/ 8)
461	BG 25(2)	IL 461(43/ 8)
467	BG 25(2)	IL 467(29/ 6)
508	BG 18(3) + GG 14(2)	IL 508(42/ 8) + 508(45/
546	BG 18(3) + GG 14(2)	IL 541(53/16) + 550(36/
583	BG 18(3) + OG 2(4)	IL 583(45/11)
589	OG 2(4)	IL 588(54/13) + 589(47/
608	OG 3(2)	IL 608(60/10)
627	RG 1(2)	IL 624(60/15) + 629(33/
647	RG 2(2)	IL 645(55/11) + 649(57/
668	RG 5(2)	IL 667(52/12) + 669(47/
681	RG 8(2)	IL 681(48/12)
705	RG 8(2)	IL 704(58/13) + 706(60/
725	-	DIL 725(10/10)*
744	RG 9(2)	IL 742(35/11) + 745(33/
801	RG 10(2)	IL 801(66/17)*

*Diese Filter waren Rundfilter (5 cm ø) und wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Mohr und Herrn Dr. G. Schoser zur Verfügung gestellt.

Tab. 6. Ermittlung der Bolometernutzfläche. Temperatur 20,0 °C. Eingestrahlte Intensität: $I = 43{,}9 \cdot 10^{-6}$ Watt/cm^2. Strom im Brückenakkumulator: i = 60,0 mA. Spannung des Kompensationsakkumulators: 2,03 V.

Blendenfläche in cm^2	Kompensationswiderstand in Ohm (Ω)	$1/\Omega \cdot cm^2$ ($\sim$I)	Abweichung in %
2	18000	$2{,}78 \cdot 10^{-5}$	0
4	9000	$2{,}78 \cdot 10^{-5}$	0
6	6100	$2{,}73 \cdot 10^{-5}$	- 2,5
8	5000	$2{,}50 \cdot 10^{-5}$	- 10,1
10	4200	$2{,}48 \cdot 10^{-5}$	- 10,8

Tab. 7. Erklärung im Text.

FK (λ in nm)	D_λ	C_λ	MGSkt ≡ 1,00 mm^3 Quanten/min
400	0,728	4900	28,4
433	0,735	5250	167
461	0,751	5470	425
467	0,783	5310	485
508	0,810	5590	688
546	0,878	5540	808
583	0,869	5980	780
589	0,850	6180	702
608	0,847	6400	577
627	0,820	6820	521
647	0,810	7120	298
668	0,790	7540	122
681	0,763	7960	71
705	0,764	8230	50
725	0,777	8320	48
744	0,759	8750	41,3
801	0,750	9530	11,7

Tab. 8. Maximal erzielbare Intensität in der Dreistrahlanlage bei Stufung 100:1:10.

FK[1] (λ in nm)	Intensität[2] in mm^3 Quanten/cm^2·min	erg/cm^2·sec
400	0,30	670
461	0,35	680
508	0,38	670
589	1,5	2300
668	2,0	2700
744	4,4	5300

[1] Filterkombinationen entsprechend Tab. 5.
[2] Die Werte sind auf die zweite Stelle gerundet.

Tab. 9. Wirkungsstärken einiger Wellenlängen zur sexuellen Aktivierung von ♀ und ♁ z. Zt. des Dunkelgametenminimums (Z = + 13...+ 15 h).

λ in nm	W_λ / W_{589} ♀	♁
400	0,36	0,42
461	2,08	2,81
508	0,39	0,19
589	1	1
627	0,33	1,20
647	0,27	0,16
668	0,07	0,04
744	0,01	0,00

Tab. 10. Zum Nachweis des reversiblen HR-DR-Reaktionssystems bei). Untersuchter Effekt: Paarungsrate G/G_p im Bereich Z = -0,5... -0,5 h. d = Dunkelkontrolle. 647/725 bedeutet z. B.: ab Z = -3,0 h wurde 1/2 Stunde belichtet mit λ = 647 nm, anschließend 1/2 Stunde mit λ = 725 nm, dann wieder dunkel. 647 + 725 bedeutet: ab Z = -2,75 h wurde 1/2 Stunde mit λ = 647 nm und gleichzeitig mit λ = 725 nm belichtet, danach wieder dunkel. Der eingestrahlte Quantenstrom war bei allen Wellenlängen konstant $\overline{N}$ = 0,149 mm^3 Quanten/min.

Bestrahlungsprogramm	$G/G_p \pm \sigma$ in %
d	41,4 ± 3,7
647 / 725	7,0 ± 1,5
725 / 647	16,1 ± 2,4
647 + 725	14,2 ± 2,5
d	85,5 ± 6,1
627 / 725	25,7 ± 3,4
725 / 627	52,0 ± 4,9
627 + 725	50,9 ± 4,8
d	91,5 ± 4,6
608 / 725	39,3 ± 3,3
725 / 608	66,2 ± 4,0
608 + 725	65,5 ± 4,0
d	81,4 ± 5,7
589 / 725	37,7 ± 4,0
725 / 589	54,3 ± 4,7
589 + 725	51,7 ± 4,6
d	79,0 ± 5,0
461 / 725	29,6 ± 3,4
725 / 461	31,0 ± 3,4
461 + 725	53,2 ± 4,4

Tab. 11. Der bei ⊕ durch einige Wellenlängen im Bereich Z = -3...-2 h zu erzielende Reversibilisierungsgrad einer durch DR induzierten Hemmung der Kopulationsbereitschaft.

λ in nm	$R_\lambda \pm \sigma$
461	0,03 ± 0,14
589	0,28 ± 0,21
608	0,42 ± 0,23
627	0,72 ± 0,33
647	0,38 ± 0,26

Tab. 12. Erklärung im Text.

Bestrahlungsprogramm	$G/G_p \pm \sigma$ in %
d	0...0,24
589	9,6 ± 1,4
725	0...0,24
589 + 725	10,1 ± 1,4
d	0...0,4
461	3,6 ± 1,0
725	0...0,4
461 + 725	2,0 ± 0,8

Tab. 14. Zur Bestimmung des Hemmungsgrades. Erklärung im Text.

G_d^1 %/G_p in %	G_d^{10} %/G_p in %	Q	Probit G_d^1 %/G_p -Probit G_d^{10} %/G_p
49	71	0,69	- 0,58
18	42	0,43	- 0,71
1,4	5,8	0,24	- 0,63
			- 0,64±0,04

Tab. 13. Erklärung im Text.

Bestrahlungs-programm	$G/G_p \pm \sigma$ in %	Erwartungswert, nach Gleichung ( ) berechnet
d	3,3 ± 1,2	
461	72,8 ± 5,2	
627	21,8 ± 3,1	
461 + 627	75,4 ± 4,9	76 (20)
d	0...0,4	
461	52,8 ± 3,9	
589	16,5 ± 2,4	
461 + 589	70,7 ± 4,5	68 (20)
d	20,2 ± 2,8	
589	60,3 ± 4,6	
725	14,5 ± 2,3	
589 + 725	49,8 ± 4,3	51 (21)

Tab. 15. Zur Demonstration der Sauerstoffabhängigkeit der sexuellen Aktivität von ♀. Erklärung im Text.

Versuch I: M = −1 h; F = +1 h.

f	♀/♂ = 4,4			♂/♀ = 5,7		
Bedingungen	2 % O_2 dunkel	20 % O_2 dunkel	Luft 1100 Lux	2 % O_2 dunkel	20 % O_2 dunkel	Luft 1100 Lux
$P/(E+2P) \pm \sigma$ in %	2,04 ± 0,40	3,42 ± 0,50	9,46	3,22 ± 0,45	4,16 ± 0,55	7,15
$G/G_p \pm \sigma$ in %	21,6 ± 4,2	36,2 ± 5,3	100	45,0 ± 6,3	58,3 ± 7,7	100
$c^{2\%}-c^{20\%}$	♂: − 0,44 a		−	♀: − 0,34 a		−

Versuch II: M = 0 h; F = +3 h.

f	♀/♂ = 3,2			♂/♀ = 5,0		
Bedingungen	1 % O_2 dunkel	20 % O_2 dunkel	Luft 1100 Lux	1 % O_2 dunkel	20 % O_2 dunkel	Luft 1100 Lux
$P/(E+2P) \pm \sigma$ in %	1,55 ± 0,35	6,15 ± 0,70	13,3	2,00 ± 0,40	12,2 ± 0,92	21,8
$G/G_p \pm \sigma$ in %	11,6 ± 2,6	46,0 ± 5,2	100	9,2 ± 1,8	56,2 ± 4,2	100
$c^{1\%}-c^{20\%}$	♂: − 1,10 a		−	♀: − 1,48 a		−

Tab. 16. Hemmung der Kopulation durch Kohlenmonoxyd, in Abhängigkeit vom %-Gehalt Kohlenmonoxyd und Sauerstoff in der Atmosphäre. Zeitpunkt des Einkippens der Test-♀ und Durchleiten der definierten Gasgemische im Bereich Z = 0...+1 h; Fixierung 1,5...3 h später. Tabelliert ist Δc in a-Einheiten mit der mittleren quadratischen Abweichung s bzw. bei Einzelbestimmungen mit dem theoretischen mittleren Stichprobenfehler $\pm\sigma$. In Klammern ist die Zahl der Bestimmungen angegeben.

a) Versuche an ♂.

Vol.-% O_2 \ Vol.-% CO	10	20	30	40	50	60	80	90
10	0,31 ±0,09 (6)		0,47 ±0,17 (1)	0,67 ±0,23 (2)	0,50 ±0,01 (3)	0,57 ±0,17 (1)		1,01 ±0,17 (3)
20		0,22 ±0,10 (2)					0,62 ±0,28 (2)	
30								
50					0,35 ±0,06 (8)			

b) Versuche an ♀.

Vol.-% O_2 \ Vol.-% CO	10	20	30	40	50	60	80	90
10	0,52 ±0,10 (2)	0,96 ±0,22 (1)		0,91 ±0,13 (3)	1,11 ±0,18 (3)			1,30 ±0,16 (2)
20	0,49 ±0,09 (3)	0,66 ±0,03 (4)		0,83 ±0,16 (3)	0,68 ±0,10 (1)		0,74 ±0,16 (4)	
30						0,91 ±0,20 (1)		
50					0,54 ±0,07 (4)			

Tab. 17. Zur Demonstration der Kohlenoxydempfindlichkeit der Kopulation von ♀. Erklärung im Text.

		Versuch I: M= -2 h;F= +1 h				Versuch II: M= -1 h;F= +2 h			
f		♀/♂ = 3,7		♂/♀ = 9,6		♀/♂ = 3,2		♂/♀ = 7,8	
Vol.-%	CO	90	-	90	-	90	-	90	-
	Ar	-	90	-	90	-	90	-	90
	O_2	10	10	10	10	10	10	10	10
P/(E+2P) ± σ in %		12,2 ±1,1	16,0 ±1,2	5,2 ±0,7	8,0 ±0,9	8,4 ±0,9	16,2 ±1,2	4,6 ±0,7	7,1 ±0,9
G/G_p ± σ in %		57 ± 5	75 ± 5	55 ± 7	85 ± 9	45 ± 5	87 ± 6	66 ± 11	98 ± 12
△ c		♂: -0,5 a		♀: -0,9 a		♂: -1,3 a		♀: -1,6 a	

Tab. 18. Kopulationshemmung durch Kohlenmonoxyd in Abhängigkeit von der Tageszeit. Versuche an Dunkelgameten (G_d/G_p) und lichtinduzierten Gameten (G_i/G_p). Kulturen aus Anzucht im 12 h:12 h L:D-Wechsel. S: Zeitpunkt des Suspendierens, M: Zeitpunkt des Einkippens der Test-♀ und Durchleiten der definierten Gasgemische jeweils in Zellzeit.

a) Versuche an ♂.

♂	Vol.-% CO				Bestrahlung in erg/cm²·sec (bzw. Lux)	S	M	G_d/G_p in 90 % Ar und 10 % O_2	G_i/G_p in 90 % Ar und 10 % O_2
Vol.-% O_2	60	70	80	90					
15	1,13 ±0,13				dunkel	-12	+ 5	0,18	-
40	0,52 ±0,18				dunkel	-12	+ 5	0,18	-
10		0,35 ±0,09	0,38 ±0,06	0,25 ±0,08	283 (74)	-13	+ 3	0,20	0,35
10		0,50 ±0,14	0,34 ±0,15	0,68 ±0,15	283 (74)	-12	+10	→ 0	0,30
10		0,89 ±0,06	1,06 ±0,09	1,37 ±0,08	306 (80)	+ 4	+11	0,26	0,72

b) Versuche an Φ.

Φ	Vol.-% CO 10	40	70	80	90	Bestrahlung in erg/cm²·sec (bzw. Lux)	S	M	G_d/G_p in 90 % A und 10 % O_2	G_i/G
Vol.-% O_2 10	$^{0,11}_{\pm 0,13}$	$^{0,35}_{\pm 0,11}$			$^{0,51}_{\pm 0,10}$	dunkel	-12	- 6	0,81	-
10			$^{2,10}_{\pm 0,21}$	$^{2,28}_{\pm 0,22}$	$^{2,39}_{\pm 0,22}$	dunkel	+ 7	+13	0,74	-
10			$^{0,96}_{\pm 0,05}$	$^{1,03}_{\pm 0,05}$	$^{1,10}_{\pm 0,06}$	187 (49)	+ 2	+ 8	0,32	0,5
10			$^{1,37}_{\pm 0,11}$	$^{1,47}_{\pm 0,11}$	$^{1,69}_{\pm 0,11}$	302 (79)	+ 5	+ 9	0,025	0,9
10			$^{1,62}_{\pm 0,18}$	$^{1,75}_{\pm 0,18}$	$^{1,65}_{\pm 0,18}$	237 (62)	+ 8	+12	0,15	0,9

Tab. 20. Erklärung im Text.

λ in nm	Sp in nm	$\varepsilon_{F/10}$	$\varepsilon_{R/10}$	$1-\frac{\varepsilon_{F/10}}{\varepsilon_{R/10}}$
400	0,05	0,132	0,467	0,72
433	0,05	0,270	0,825	0,67
461	0,05	0,245	0,573	0,57
467	0,05	0,282	0,630	0,55
508	0,04	0,013	0,036	0,64
546	0,035	0,005	0,031	0,84
583	0,035	0,004	0,066	0,94
589	0,035	0,005	0,072	0,93
608	0,05	0,002	0,110	0,98
627	0,05	0,003	0,114	0,97
647	0,05	0,005	0,204	0,98
668	0,05	0,001	0,388	1,00
681	0,05	0,001	0,084	0,99
705	0,05	→0	0,003	-
725	0,045	0,001	→0	-
744	0,045	→0	→0	-
801	0,035	→0	→0	-

Tab. 19. Erklärung im Text.

Zellzeit in h	Extinktion bei 405 nm	
ab -10,0	aerob	
- 2,5	0,054	
ab - 2,5	aerob	anaerob
+ 3,0	0,080	0,187
ab + 3,0	aerob	anaerob
+17,0	0,090	0,190

Tab. 21. Zur Bestimmung des Quantenbedarfs der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung bei Θ. N_V= 2,18 mm^3 Quanten/min bei λ = 668 nm; d_{668}= 0,10; 36 mm^3 Zellen/4 cm^3 im Hauptraum; 0,4cm^3 KOH 20 % in Wanne und Birne; k_{O_2}= 1,388; pH =7,0.

Zellzeit	△t in min	hell=h dunkel=d	△p in mm Brodie	O_2-Verbrauch in mm^3	Q_{O_2}
-0^{25}					
-0^{05}	20	d	-11,0	15,3	1,27
$+0^{10}$	15	h	- 7,0	9,7	1,08
$+0^{15}$	5	d	- 2,5	3,5	1,16
$+0^{30}$	15	d	-99,5	13,2	1,46
$+0^{45}$	15	h	- 7,0	9,7	1,08
$+0^{50}$	5	d	- 2,5	3,5	1,16
$+1^{05}$	15	d	- 9,5	13,2	1,46
$+1^{20}$	15	h	- 7,0	9,7	1,08
$+1^{25}$	5	d	- 2,5	3,5	1,16
$+1^{40}$	15	d	-10,0	13,9	1,54
Σ_h	45	h	-21,0	29,2	1,08
Σ_d	45	d	-29,0	40,2	1,49

Tab. 22. Quantenbedarf der photosyntnetischen Sauerstoffentwicklung bei verschiedenen Quantenströmen und Tageszeiten, gemessen an ⊖.

Versuchszeit in Zellzeit	N_V in mm^3 Quanten/min	λ in nm	d_λ	$\frac{1}{\varphi}$	$Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$
$-3^{15}...-1^{30}$	3,78	668	0,10	11,6	0,74
$-0^{05}...+1^{40}$	2,18	668	0,10	8,0	0,73
$+14^{00}...+24^{47}$	20,6	681	0,18	33,4	0,20
$+45^{30}...+49^{00}$	0,40	681	0,20	11,6	0,94
$+45^{05}...+48^{55}$	0,45	668	0,17	6,6	0,86
$+45^{25}...+49^{05}$	0,47	668	0,15	12,5	0,93
$+46^{30}...+53^{50}$	17,1	681	0,18	49,3	0,32
Mittelwert ± s für $N_V < 4$: $1/\varphi = 10,1 \pm 1,2$.					

Tab. 23. Lichtinduzierte Atmung bei ♂.

$\bar{N}$ in mm^3 Quanten/min	Bestrahlung und Messung im Bereich Z=	λ in nm	$Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$	$Q_{O_2}^{PO\lambda}/Q_{O_2}^{d}$	W_λ ±
0,52	$23^{30}...26^{00}$	589 461	1,291 1,023	1,337 1,064	1 0,19±0,0
0,52	$23^{30}...27^{30}$	589 461	1,590 0,963	1,773 1,151	1 0,20±0,0
0,52	$26^{00}...30^{00}$	589 627	1,405 1,377	1,528 1,532	1 1,01±0,0
0,35	$34^{00}...36^{30}$	589 461	1,155 0,974	1,191 1,006	1 0,03±0,1
0,52	$46^{00}...50^{00}$	589 647	2,51 1,91	2,64 2,11	1 0,68±0,0
0,52	$56^{30}...59^{00}$	589 508	1,104 0,967	1,138 0,996	1 -0,03±0,1

Tab. 24. Atmung von ⊕ unter Einwirkung von Störlicht. Von Z = $-3^{00}...-2^{30}$ h ab wurde bestrahlt mit $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min. Der Bestrahlungsendpunkt lag im Bereich Z = $+0^{30}...+2^{25}$ h. Die Bestimmung von $Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$ und damit W_λ erfolgte aus dem Bereich: 1 Stunde nach Belichtungsbeginn bis Belichtungsende. Bezugswellenlänge war λ_o = 725 nm mit W_{725} = - 1.

λ	$W_\lambda \pm \sigma$ (n)	$0{,}596 \cdot (W_\lambda \pm \sigma)$
801	-0,86±0,25 (2)	-0,51±0,15
744	-1,45±0,24 (1)	-0,86±0,14
725	-1 (9)	-0,60
704	-0,76±0,18 (1)	-0,45±0,11
647	+0,68±0,51 (1)	+0,41±0,30
589	-0,04±0,12 (1)	-0,02±0,07
461	-0,33±0,49 (1)	-0,20±0,29
400	+0,33±0,48 (1)	+0,20±0,29

Tab. 25. Lichtinduzierte Atmung bei ♀. Der mittlere Quantenstrom in der Suspension war bei allen Versuchen $\bar{N}$ = 0,204 mm^3 Quanten/min.

Bestrahlung und Messung im Bereich Z =	λ in nm	$Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$	$Q_{O_2}^{PO\lambda}/Q_{O_2}^{d}$	$W_\lambda \pm \sigma$
$-3^{50}...+1^{07}$	744	1,000	1,001±0,016	-
	668	0,980	1,031±0,021	-
$-2^{52}...+0^{17}$	744	1,047	1,047±0,019	-
	589	1,014	1,039±0,022	-
$+45^{32}...+50^{07}$	744	1,003	1,003±0,014	0,03±0,24
	589	1,052	1,101±0,019	1
$+46^{05}...+49^{18}$	668	0,964	1,056±0,025	0,46±0,27
	589	1,070	1,122±0,021	1
$+45^{13}...+48^{37}$	508	1,012	1,043±0,019	0,65±0,39
	589	1,042	1,066±0,017	1

XXVIII. Abbildungen

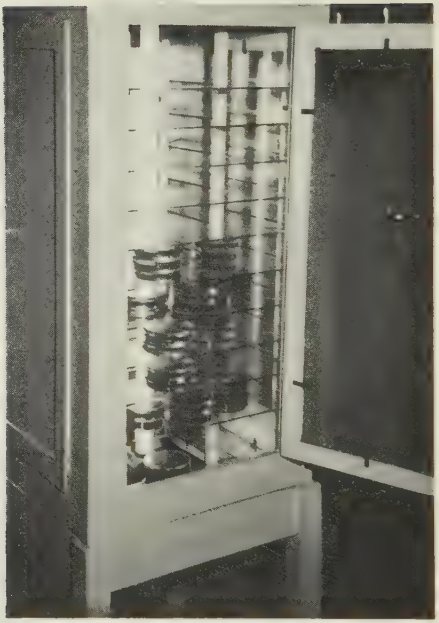


Abb. 1. Künstliche Sonne. Abmessungen: 50 · 50 · 100 cm. Zentral senkrecht montierte Leuchtstofflampe; Innenflachen mit Spiegelglas ausgekleidet; Grund- und Deckplatte mit Öffnungen zur Luftzirkulation.

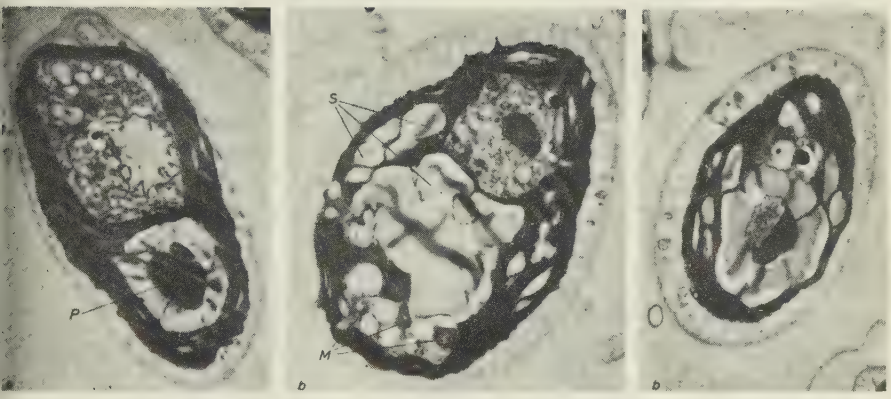


Abb. 2. Chlamydomonas moewusii ♀ im Schnitt, Vergrößerung 10 000-fach.
a) 6-d-Kultur: Das Pyrenoid ist relativ klein, im Chloroplasten treten nur vereinzelt kleine interlamellare Einschlüsse auf.
b) 30-d-Kultur: Das Pyrenoid ist stark entwickelt und die Chloroplastenstruktur durch eingelagerte Stärkeplatten stark aufgelockert. Bei den kugeligen stark elektronenabsorbierenden Einlagerungen handelt es sich um Öltröpfchen.
P = Pyrenoid; S = Stärkeplatten; M = Mitochondrien.

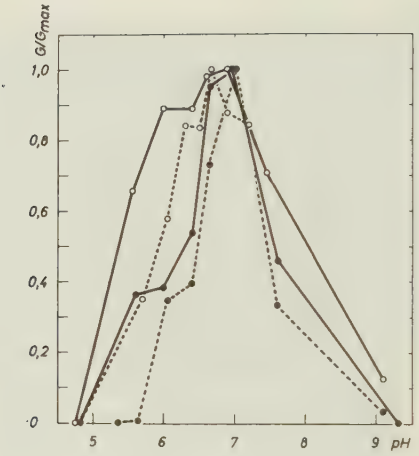


Abb. 3. Abhängigkeit der Paarungsrate vom pH-Wert des Mediums. 20 °C; Ionenstärke $\mu \approx 2 \cdot 10^{-3}$.

Zeichen	Klon (V;w)	Testklon (V;w)	G_{max}	$\sigma_{G/G_{max}}$	pH-Optimum (3σ-Bereic
o——o	⊕ (9;0,8·10^{-3})	♀ (1;10·10^{-3})	0,51	4 %	5,95...7,1
o...o	⊕ (9;0,6·10^{-3})	♀ (1; 8·10^{-3})	0,57	4 %	6,55...6,9
•——•	♂ (9;0,6·10^{-3})	♀ (1;5,5·10^{-3})	0,063	3 %	6,60...7,0
•...•	♂ (9;0,7·10^{-3})	♀ (1;6,5·10^{-3})	0,26	4 %	6,85...7,1

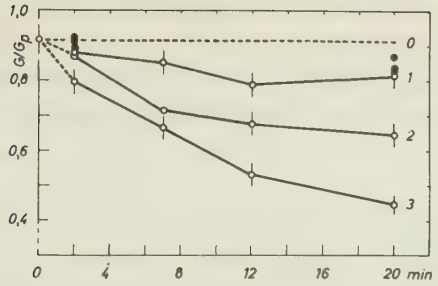


Abb. 4. Der Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Paarungsrate von ♀, 28-d-Kultur. Abszisse: Gibt an, wieviel min vor dem Einpipettieren der Testzellen die Salzkonzentrationen in der ♀-Suspension eingestellt worden sind. Ordinate: Paarungsrate von ♀, bestimmt im Bereich Z = $+0^{05}$...$+2^{03}$ h; G_p = 71 %. 0 = ohne Zusatz; 1 = $5 \cdot 10^{-5}$ mol NH_4Cl; 2 = $2 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl; 3 = $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl; Proben mit $5 \cdot 10^{-5}$...$5 \cdot 10^{-4}$ mol KCl sind als • eingezeichnet. Die angegebenen Fehler entsprechen dem $\pm\sigma$-Bereich. ♀: V = 1,0; w = $2 \cdot 10^{-3}$; Salze wurden in 0,5 cm^3 H_2O zugegeben. Testklon: ♀, 34-d-Kultur; V = 1,0; w = $4 \cdot 10^{-3}$. pH = 6,7 ± 0,1; 20 °C.

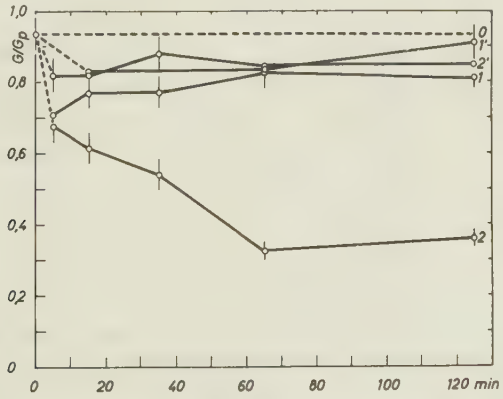


Abb. 5. Der Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Paarungsrate von ♀, 23-d-Kultur. G/G_p bestimmt im Bereich Z = $+0^{15}$...$+1^{30}$ h; G_p = 57 %. 0 = ohne Zusatz; 1 = $2 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl; 1' = $2 \cdot 10^{-4}$ mol KCl; 2 = $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl, 2' = $5 \cdot 10^{-4}$ mol KCl. ♀: V = 1,0; w = $3 \cdot 10^{-3}$. Testklon: ♀, 30-d-Kultur; V = 2,0; w = $3,5 \cdot 10^{-3}$. Sonst wie bei Abb. 4.

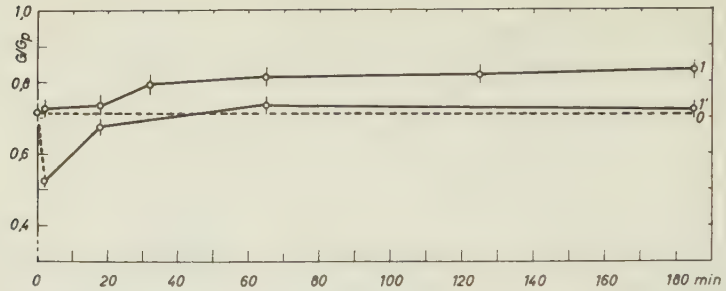


Abb. 6. Der Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Paarungsrate von ♀, 32-d-Kultur. G/G_p bestimmt im Bereich Z = $+1^{00}...+3^{45}$ h; G_p = 57 %. 0 = ohne Zusatz; 1 = $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl; 1' = $3{,}3 \cdot 10^{-4}$ mol KCl. ♀: V = 1,0; w = $6 \cdot 10^{-3}$. Testklon: ♀, 32-d-Kultur; V = 1,5; w = $8 \cdot 10^{-3}$. Sonst wie bei Abb. 4.

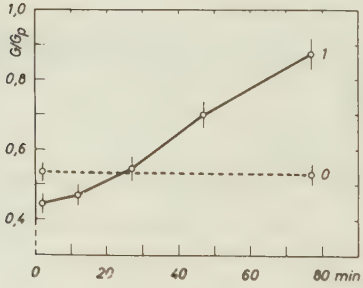


Abb. 7. Der Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Paarungsrate von ♀, 41-d-Kultur. G/G_p bestimmt im Bereich: Z = $+0^{45}...+1^{35}$ h; G_p = 30 %. 0 = 0,25 cm^3 H_2O zugegeben; 1 = 10^{-4} mol NH_4Cl. V = 2,0; w = $2{,}5 \cdot 10^{-3}$; Salze wurden in 0,25 cm^3 H_2O gelöst zugegeben. Testklon: ♀, 41-d-Kultur; V = 2,0; w = $7{,}5 \cdot 10^{-3}$. Sonst wie bei Abb. 4.

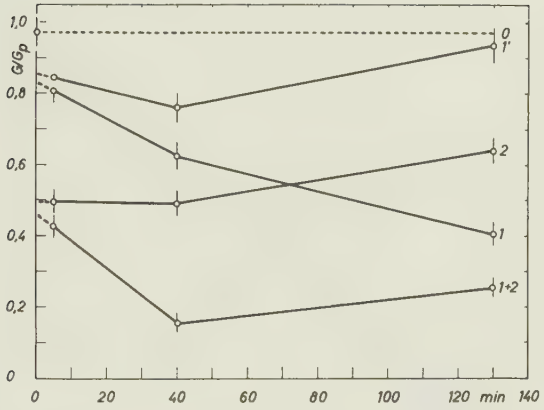


Abb. 8. Der Einfluß von Ammoniumchlorid und Blausäure auf die Paarungsrate von ♀, 16-d-Kultur. G/G_p bestimmt im Bereich Z = $+1^{30}...+3^{25}$ h; G_p = 72 %. 0 = ohne Zusatz; 1 = $4{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl; 1' = $5 \cdot 10^{-4}$ mol KCl; 2 = $4{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol KCN. ♀: V = 3,0; w = $0{,}4 \cdot 10^{-3}$; Salze wurden in 0,3 cm^3 S gelöst zugegeben. Testklon: ♀, 29-d-Kultur; V = 0,5; w = $6 \cdot 10^{-3}$. pH = 6,9 ± 0,1. Sonst wie bei Abb. 4.

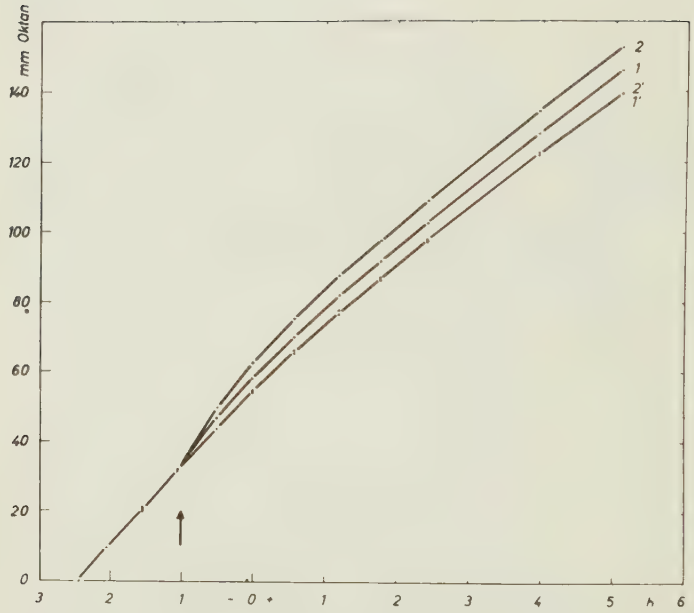


Abb. 9. Der Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Atmung von ⊕, 28-d-Kultur. Abszisse: Zeitzeit in Stunden. Ordinate: Druckunterschiede in mm Oktan. Um Z = - 1^{00} h wurde eingestellt in: 1 = $3{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol NH_4Cl; 1' = $3{,}2 \cdot 10^{-5}$ mol KCl (7,2); 2 = $1{,}4 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl (7,1); 2' = $1{,}4 \cdot 10^{-4}$ mol KCl; Werte in Klammern sind die pH-Werte bei Versuchsende. Kegelgefäße, im Hauptraum: V = 3,0 mit w = $5 \cdot 10^{-3}$; im Einsatz: 0,3 cm^3 KOH 20 %; Salze in 0,5 cm^3 H_2O gelöst in der Birne; κ_{O_2} = 0,927.

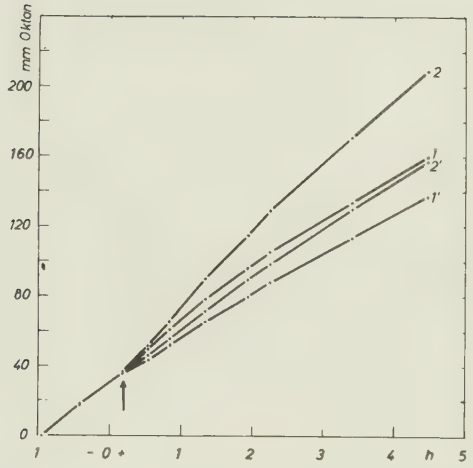


Abb. 10. Der Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Atmung von ♀, 29-d-Kultur. Um Z = $+0^{13}$ h wurde eingestellt in: 1 = 10^{-4} mol NH_4Cl (7,1); 1' = 10^{-4} mol KCl (7,3); 2 = 10^{-3} mol NH_4Cl (6,3); 2' = 10^{-3} mol KCl (7,2); die Werte in Klammern sind die pH-Werte bei Versuchsende. Die Beweglichkeit der Zellen aus 2 und 2' war bei Versuchsende gegenüber 1 und 1' deutlich verschlechtert. Kastengefäße, im Hauptraum: V = 4,0 mit w = $6 \cdot 10^{-3}$; in der Wanne: 0,3 cm^3 KOH 20 %; Salze in 0,44 cm^3 H_2O gelost in der Birne; κ_{O_2} = 0,972. Übrige Angaben wie in Abb. 9.

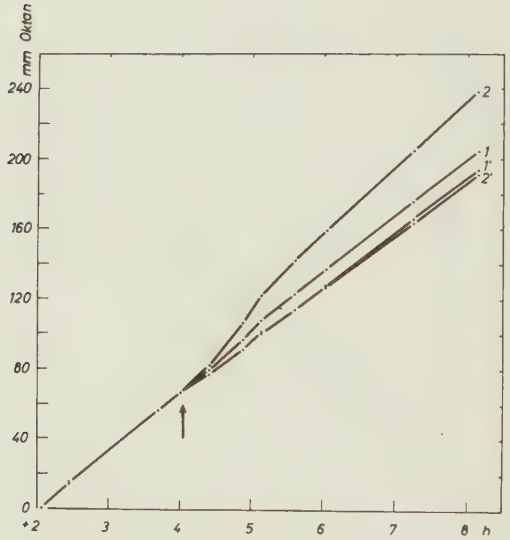


Abb. 11. Der Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Atmung von ♀, 30-d-Kultur. Um Z = + 4^{03} h wurde eingestellt in: 1 = 10^{-4} mol NH_4Cl (7,0); 1' = 10^{-4} mol KCl (7,1); 2 = $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl (6,9); 2' = $5 \cdot 10^{-4}$ mol KCl (7,1); die Werte in Klammern sind die pH-Werte bei Versuchsende. Kegelgefäße, Beschickung wie bei Abb. 9 angegeben, jedoch w = $6 \cdot 10^{-3}$. Übrige Angaben ebenfalls wie in Abb. 9.

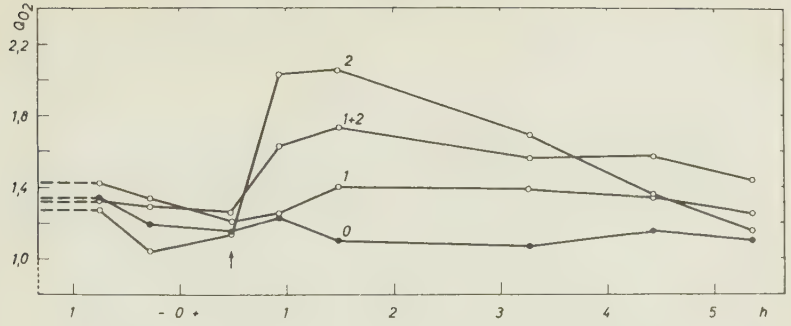


Abb. 12. Der Einfluß von Ammoniumchlorid und Blausäure auf die Atmung von ♀, 27-d-Kultur. Abszisse: Zeitzeit in Stunden; Ordinate: Atmungsgröße in mm^3 O_2/mm^3 Zellen·h. Um Z = $+0^{27}$ wurde eingestellt in: 0 = Kontrolle (0,4 cm^3 S zugegeben); 1 = $4{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol KCN; 2 = $4{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl; 1+2 = $4{,}5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4 Cl + $4{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol KCN. Kastengefäße, im Hauptraum: V = 4,0 mit w = $5 \cdot 10^{-3}$; in der Wanne: 0,3 cm^3 KOH 20 %; Salze in 0,4 cm^3 S gelöst in der Birne; k_{O_2} = 1,02.

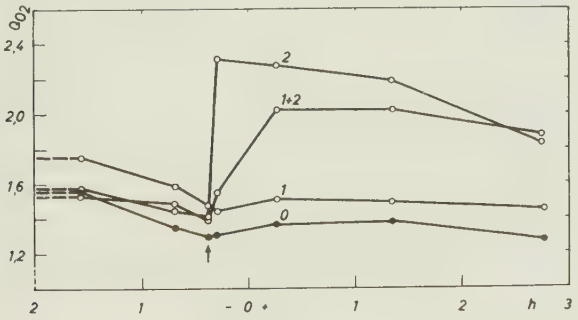


Abb. 13. Der Einfluß von Ammoniumchlorid und Blausäure auf die Atmung von ♀, 33-d-Kultur. Bezeichnungen wie in Abb. 12. Um Z = -0^{15} h wurde eingestellt in: 0 = Kontrolle (0,2 cm^3 S zugegeben); 1 = $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol KCN; 2 = $4{,}7 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl; 1+2 = $1{,}5 \cdot 10^{-5}$ mol KCN + $4{,}7 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl. Kegelgefäße, im Hauptraum: V = 3,0 mit w = $5{,}2 \cdot 10^{-3}$; im Einsatz: 0,3 cm^3 KOH 20 %; Salze in 0,2 cm^3 S gelöst in der Birne; k_{O_2} = 0,906.

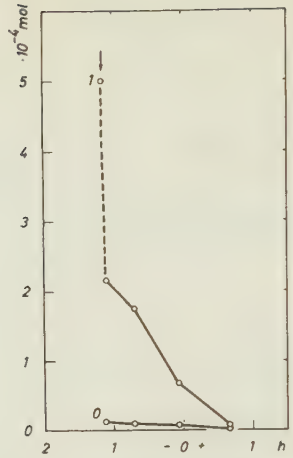


Abb. 14. Aufnahme von Ammoniumionen aus dem Medium bei ♀, 33-d-Kultur. Abszisse: Zeitzeit in Stunden; Ordinate: molare Konzentration an Ammoniumionen. V = 40; w = $5{,}2 \cdot 10^{-3}$; um Z = -1^{09} h wurde zugegeben zu: 0 = 2 cm^3 S; 1 = 2 cm^3 10^{-2} mol NH_4Cl in S ≡ $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl.

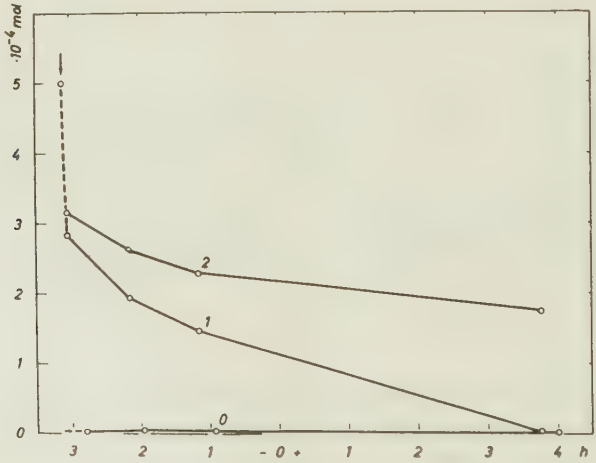


Abb. 15. Ammoniumaufnahme und ihre Hemmung durch Blausäure bei ♀, 29-d-Kultur. Bezeichnungen wie in Abb. 14. V = 20,0; w = $4{,}6 \cdot 10^{-3}$; um Z = -3^{07} h wurde zugegeben zu: 0 = 2 cm^3 S; 1 = 1 cm^3 S + 1 cm^3 10^{-2} mol NH_4Cl in S ≡ $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl; 2 = 1 cm^3 10^{-2} mol NH_4Cl in S + 1 cm^3 10^{-3} mol KCN in S ≡ $5 \cdot 10^{-4}$ mol NH_4Cl + $5 \cdot 10^{-5}$ mol KCN.

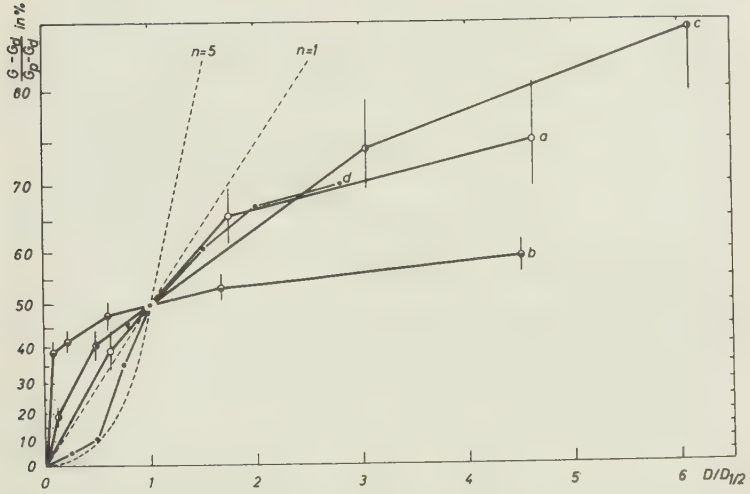


Abb. 16. Dosis-Effekt-Kurven der sexuellen Aktivierung bei ⊖. Erklärung im Text.

Bez.	G_p	G_d/G_p	t (min)	E (Lux)	$D_{1/2}$ (lm·h/m^2)	°C
a	0,59	0,85	const=60	$E_{1/2}$=0,08	0,08	18
b	0,62	0,16	const=60	$E_{1/2}$=0,60	0,60	18
c	0,65	0,14	const=60	$E_{1/2}$=0,82	0,82	18
d	-	0	$t_{1/2}$ =10	const=3000	510	25

d nach Angaben von LEWIN[87]. Angegebene Fehler ± σ-Bereich.

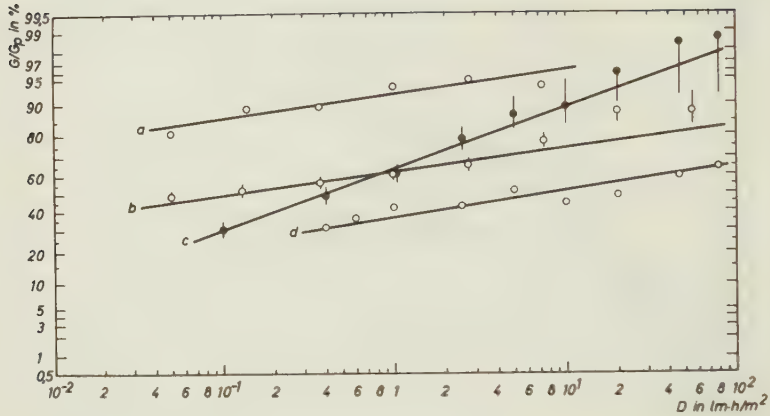


Abb. 17. Dosis-Effekt-Kurven der sexuellen Aktivierung bei ♀, im Wahrscheinlichkeitsnetz. Abszisse: Dosis D in $lm \cdot h/m^2$, eingestrahlt bei konstanter Expositionsdauer t = 60 min. Ordinate: Paarungsrate G/G_p in %. Angegebene Fehler $\pm\sigma$-Bereich.

Bez.	G_p	G_d/G_p	°C
a	0,75	0,75	18
b	wie in Abb.16		
c	wie in Abb.16		
d	0,25	0	18

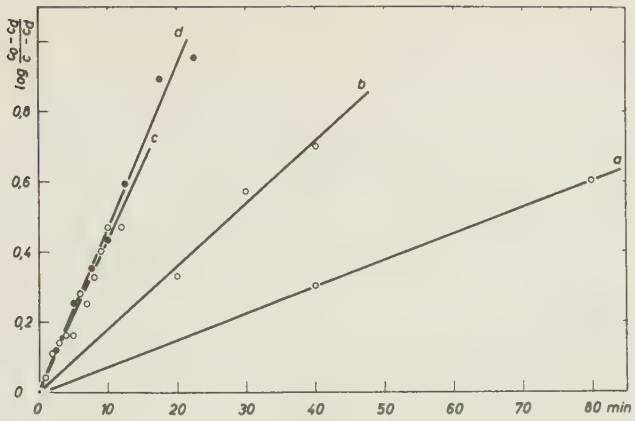


Abb. 18. Rückreaktion bei verschiedenen Temperaturen. Abszisse: Zeit t in min. Ordinate: Verhältnis der Konzentrationsunterschiede des Kontrollsubstrates, logarithmisch aufgetragen. Erklärung im Text.

Bez.	Klon (Testk.)	V (cm^3)	w $\cdot 10^{-3}$	aktiviert	G_p (%)	G_d (%)	G_o/G_p (%)	t_o (min)	$t_{G_p/2}$ (min)
a	⊕ (♀)	2 (4)	0,6 (1,6)	120 min 1000 Lux	98	63	90	40	-
b	⊕ (♀)	2 (4)	0,6) (1,0)	30 min 1000 Lux	83	44	80	10	-
c	⊕ (⊖)	-	-	60 min 1000 Lux	-	-	90	2,0	4,5
d	♂ (♀)	5 (4)	2 (5)	35 min 10^{-5} cal/ $cm^2 \cdot sec$ bei λ = 589 nm	84	5,5	95	2,5	9,3

Bez.	$k \cdot 10^{-4}$ (sec^{-1})	τ (min)	°C	$1/T \cdot 10^{-3}$
a	2,83	41	14,5	3,48
b	6,8	17	23,0	3,38
c	16,5	7,0	35	3,25
d	18	6,3	18	3,44

c nach Daten von LEWIN[87].
d nach Daten von FÖRSTER[37].

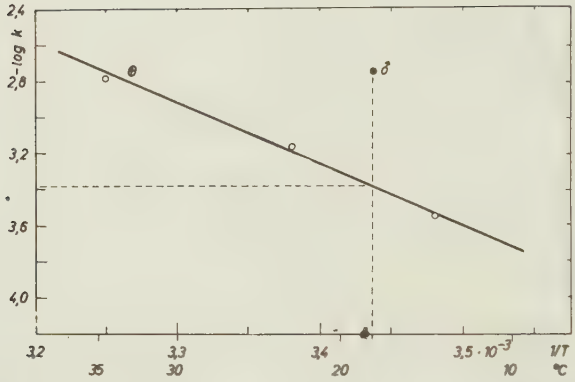


Abb. 19. Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Rückreaktion. Abszisse: 1/T = Kehrwert der absoluten Temperatur bzw. Celsiusskala. Ordinate: log k = Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten k in sec^{-1}. Ausgezeichnete Werte: $k_{18^\circ\,\Theta} = 4{,}2 \cdot 10^{-4}$ sec^{-1}; $k_{20^\circ\,\Theta} = 5{,}0 \cdot 10^{-4}$ sec^{-1}; $k_{18^\circ\,\delta} = 1{,}8 \cdot 10^{-3}$ sec^{-1}.

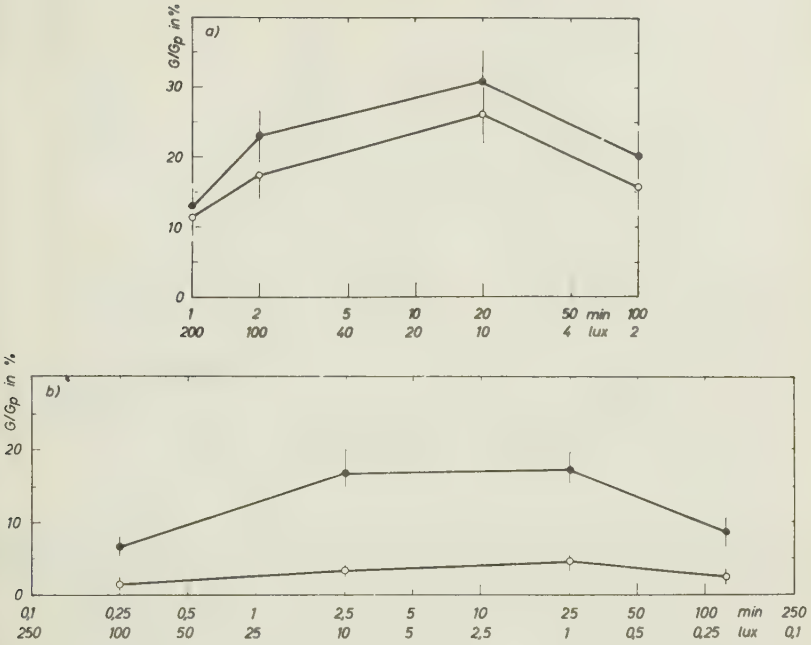


Abb. 20. Reaktion auf die gleiche Dosis weißen Lichtes (HNW) bei Variation der Expositionsdauer. Versuche an ♀: o——o; an ♂: •——•. Angegeben Fehler $\pm \sigma$. Abszisse: Zeit t in min bzw. Beleuchtungsstärke E in Lux. Ordinate: Paarungsrate G/G_p.
a) Dosis konstant = E·t = D = 3,33 lm·h/m^2. B = $+4^{10}$ h; F = $+7^{11}$ h. ♀: V = 4; w = $0{,}2 \cdot 10^{-3}$; G_d = 0,006; G_p = 0,92. ♂: V = 4; w = $0{,}3 \cdot 10^{-3}$; G_d = 0,025; G_p = 0,96. Testklon: ♀; V = 1,0; w = $6 \cdot 10^{-3}$
b) Dosis konstant = E·t = D = 0,417 lm·h/m^2. B = $+5^{05}$h; F = $+7^{11}$ h. ♀: V = 3; w = $0{,}25 \cdot 10^{-3}$; G_d = 0,03; G_p = 0,75. ♂: V = 3; w = $0{,}3 \cdot 10^{-3}$; G_d = 0,005; G_p = 0,80. Testklon: ♀; V = 0,5; w = $6 \cdot 10^{-3}$.

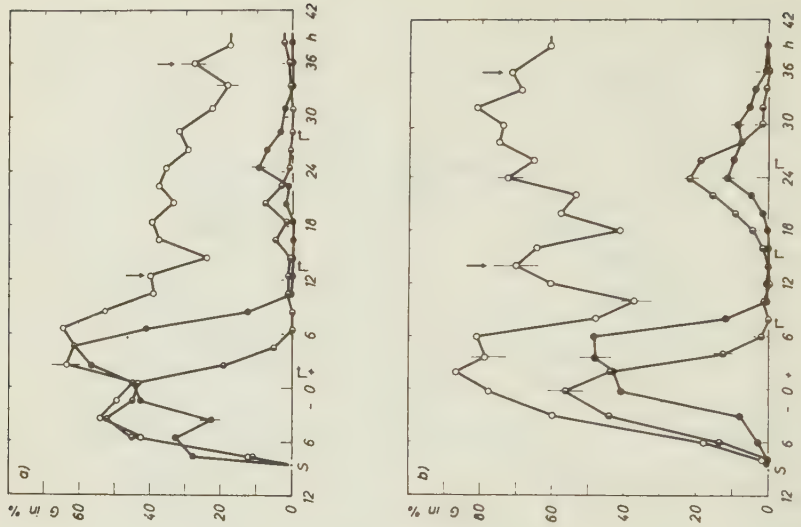


Abb. 21. Verlauf von Dunkelgametentiter und Lichtinduzierbarkeit bei ♂ und ♀ nach Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel und anschließender Wärme-bzw. Kältebehandlung im Dunkeln vor dem Suspendieren. Abszisse: Zellzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G, bestimmt bei Reaktionszeiten von 2(...3) h.

a) ●: Dunkelgametentiter von ♀, 23-d-Kultur, nach 48-stündiger bei Nacht einsetzender Dunkelbehandlung bei 15 °C, dann suspendiert (= S) bei 20 °C.

◐: dito, nach 48-stündiger bei Nacht einsetzender Dunkelbehandlung bei 24 °C, dann suspendiert bei 20 °C.

o: Lichtinduzierbarkeit bei Belichtung mit konstant 110 Lux HNW während der Reaktionszeit nach gleicher Vorbehandlung wie ◐.

b) ●: Dunkelgametentiter von ♂, 25-d-Kultur, nach Behandlung wie a) ●.

◐: dito, wie a) ◐.

o: dito, wie a) o, jedoch bei konstant 480 Lux HNI.

Testklon: ♀, 25...30-d-Kulturen aus phasenverschobenen Anzuchtrhythmen, in 2...4-facher Konzentration zu ♀ bzw. ♂ nur im Bereich Z = -4...+10 h verwendet. ↱ = ♀-Wechsel. Angegebene Fehler = $\pm\sigma$ -Bereich.

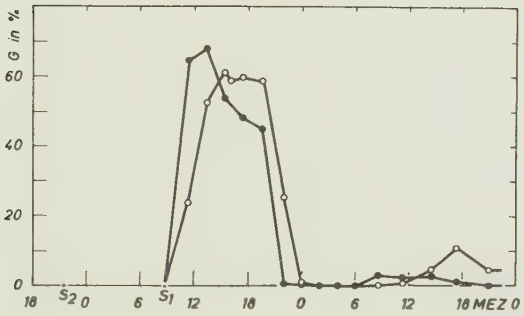


Abb. 22. Hinweis für tagesrhythmisches Schwanken des Dunkelgametentiters von ♀, nach Anzucht im L:D-Wechsel. Abszisse: MEZ in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G, berechnet für ♀, bei Reaktionszeiten von 2...3 h. o: Versuche mit ♀ aus Anzucht L = 18^{00}...8^{00}: D = 8^{00}...18^{00}, suspendiert z. Zt. S_1. •: Versuche mit ♀ aus Anzucht L = 7^{00}...21^{00}: D = 21^{00}...7^{00}, suspendiert z. Zt. S_2. Testklon: ♀, aus Anzucht L = 18^{00}...8^{00}: D = 8^{00}...18^{00}, suspendiert z. Zt. S_1, angewendet in 1- bzw. 2-facher Konzentration zu ♀.

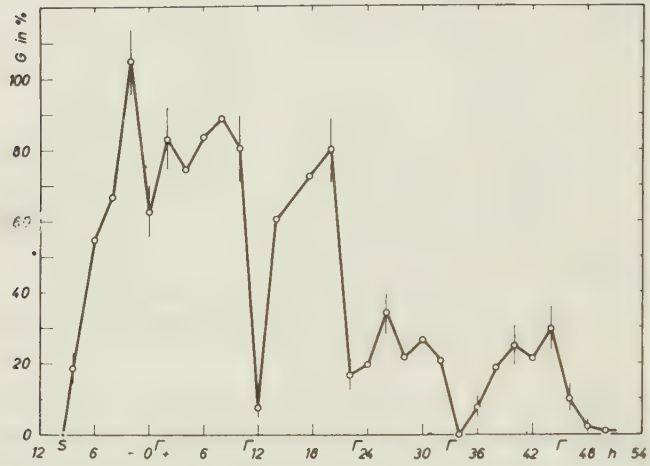


Abb. 23. Tagesperiodische Schwankungen im Dunkelgametentiter von ♀ (32-d-Kultur), nach Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel. Abszisse: Zellzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate berechnet für ♀, bei Reaktionszeiten von 2(...3) h. Testklon: ♁, 25...30-d-Kulturen aus phasenverschobenen Anzuchtrhythmen, in 8,25...12,0-facher Konzentration zu ♀, nur im Bereich Z = -6...+4 h verwendet. ⌜ = ♁-Wechsel. Angegebene Fehler = $\pm\sigma$-Bereich.

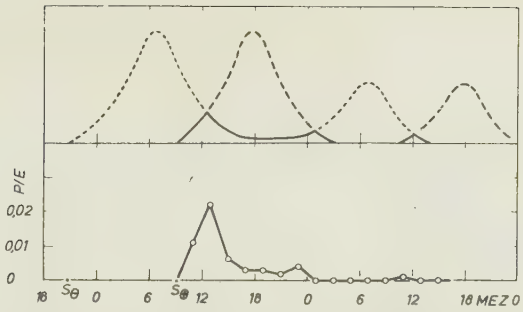


Abb. 24. Überlagerung zweier Aktivitätsrhythmen. Abszisse: MEZ in h. Ordinate: Verhältnis von Pärchen = P zu Einzelzellen = E im Ansatz. Verwendete Klone: ♀, 15-d-Kultur aus L:D-Wechsel = $18^{00}...8^{00}:8^{00}...18^{00}$, suspendiert um $S_♀$, dann DD. ♂, 15-d-Kultur aus L:D-Wechsel = $7^{00}...21^{00}:21^{00}...7^{00}$, suspendiert um $S_♂$, dann DD. Reaktionszeit: 2 h. Über der gemessenen Kurve ist das Schema zur Interpretation der Überlagerung angegeben; die gestrichelte Kurve gibt den vermuteten Aktivitätsverlauf der ♀-Kultur wieder, die gepunktete Kurve den der ♂-Kultur.

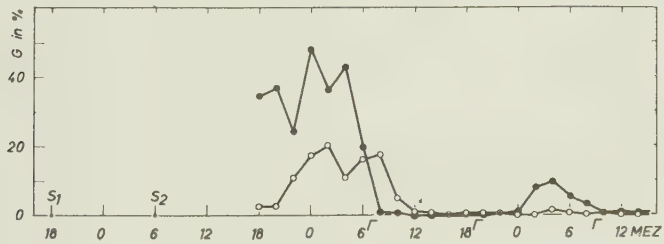


Abb. 25. Der Einfluß des Suspendierzeitpunktes S auf die Phasenlage der Dunkelgametenrhythmik von ♂, nach Anzucht im L:D-Wechsel. Abszisse: MEZ in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G berechnet für ♂, bei Reaktionszeiten von 2 h. o: Versuche mit ♂ (25-d-Kulturen) aus Anzucht L = $6^{00}...18^{00}$: D = $18^{00}...6^{00}$, suspendiert um S_1. •: dito, suspendiert um S_2. Testklone: ♀, 25...30-d-Kulturen aus phasenverschobenen Anzuchtrhythmen, nur im Bereich Z = −4...+10 h in 2,5...3,25-facher Konzentration zu ♂ angewendet. ⌜ = ♀-Wechsel.

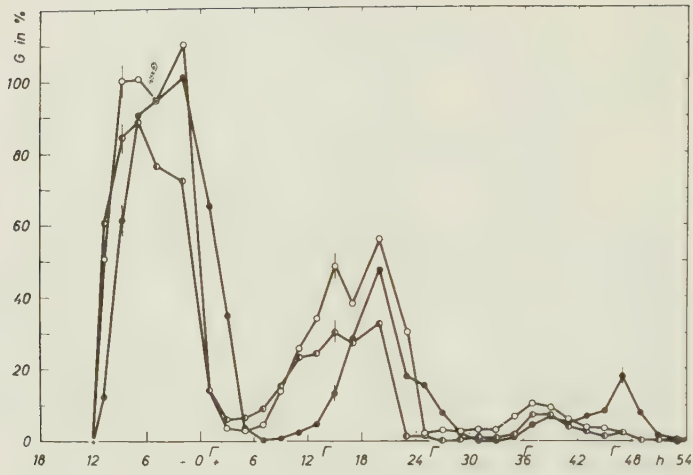


Abb. 26. Der Einfluß einer 12-stündigen Abkühlung auf die Phasenlage der Dunkelgametenrhythmik von ⊕, nach Anzucht im L:D-Wechsel. Abszisse: Zeitzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G berechnet für ⊕, bei Inkubationszeiten von 2...3 h. Objekt: ⊕, 23-d-Kultur aus Anzucht bei 12 h:12 h L:D-Wechsel.
o: Versuche mit Kulturen, die um Z = -36 h ins DD gebracht und um S = -12 h suspendiert worden sind.
●: Wie o, jedoch im Bereich Z = -24...-12 h auf 14 °C gehalten.
◐: Wie o, jedoch im Bereich von Z = -36...-24 h auf 14 °C gehalten.
Testklone: ♀, 23...26-d-Kulturen aus phasenverschobenen Anzuchtrhythmen, nur im Bereich Z = -4...+10 h in 1,6...4,0-facher Konzentration zu ⊕ angewendet. Γ = ♀-Wechsel.

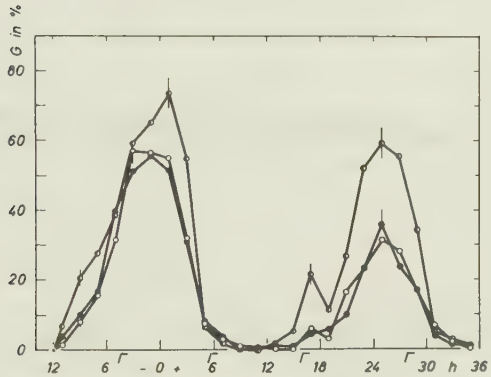


Abb. 27. Der Einfluß einer 6-stündigen Abkühlung auf die Phasenlage der Dunkelgametenrhythmik von ♂, nach Anzucht im L:D-Wechsel. Abszisse: Zeitzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G berechnet für ♂, bei Inkubationszeiten von 2 h. Objekt: ♂, 25-d-Kulturen aus Anzucht bei 12 h:12 h L:D-Wechsel.
o: Versuche mit ♂, die um Z = -36 h ins DD gebracht und um S = -12 h suspendiert worden sind.
●: Wie o, jedoch im Bereich Z = -36...-30 h auf 4 °C gehalten.
◐: Wie o, jedoch im Bereich Z = -30...-24 h auf 4 °C gehalten.
Testklone: ♀, 26...28-d-Kulturen aus phasenverschobenen Anzuchtrhythmen, nur im Bereich Z = -4...+10 h in 2,1...3,5-facher Konzentration zu ♂ angewendet. ⌜ = ♀-Wechsel.

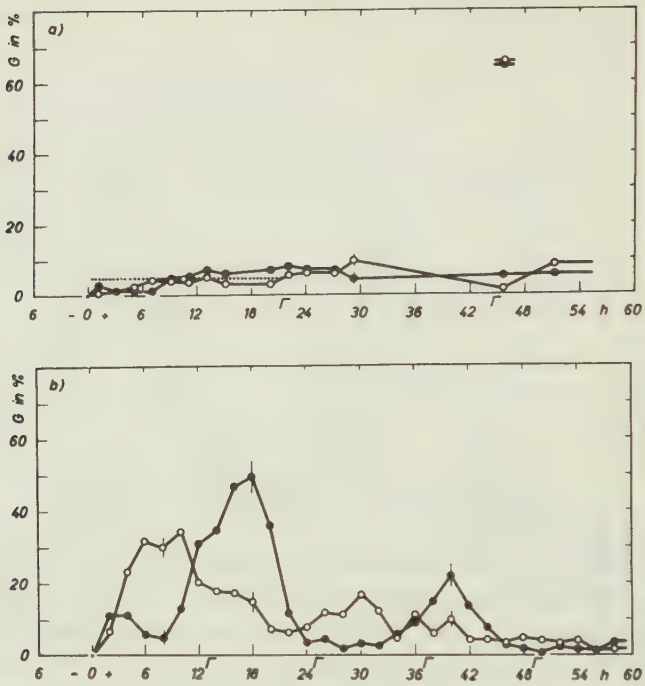


Abb. 28. Die sexuelle Aktivität von DL-Kulturen nach Überführung ins DD bei gleichzeitigem und 12 h später erfolgtem Suspendieren. Abszisse: Zeitzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G. Angegebene Fehler = $\pm \sigma$ -Bereich.

a) Versuche an ♂ (26-d-Kulturen) mit Inkubationszeiten von 2(...21) h.

o: Überführung ins DD und Suspendieren gleichzeitig. Eine Langzeitinkubation von 21 h punktiert eingetragen.

●: Überführung ins DD 12 h vor dem Suspendieren.

Testklone: ♀, 33-d-Kulturen aus 14 h:10 h L:D-Wechsel, in 1,7... facher Konzentration zu ♂ angewendet, ⌜ = ♀-Wechsel.

b) Versuche an ♀ (23-d-Kulturen) mit Inkubationszeiten von 2 h.

o: Wie a) o. ●: Wie a) ●.

Testklone: ♀, 25...33-d-Kulturen, aus phasenverschobenen 14 h:10 und 12 h:12 h L:D-Wechseln, in 2,2...2,9-facher Konzentration zu ♀ angewendet. ⌜ = ♀-Wechsel.

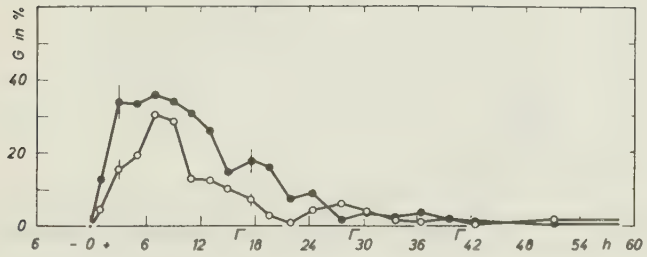


Abb. 29. Die sexuelle Aktivität von DL-Kulturen nach Überführung ins DD bei gleichzeitigem und 6 h später erfolgtem Suspendieren. Abszisse: Zellzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G. Angegebene Fehler = $\pm \sigma$-Bereich. Versuche an ⊖ (15-d-Kulturen), mit Inkubationszeiten von 2...3 h, letzte Probe mit 14,5 h.
o: Überführung ins DD und Suspendieren gleichzeitig.
●: Überführung ins DD 6 h vor dem Suspendieren.
Testklone: ♀, 33...37-d-Kulturen aus phasenverschobenen 14 h:10 h und 12 h:12 h L:D-Wechseln in 2,6...3,0-facher Konzentration zu ⊖ angewendet. ⌜ = ♀-Wechsel.

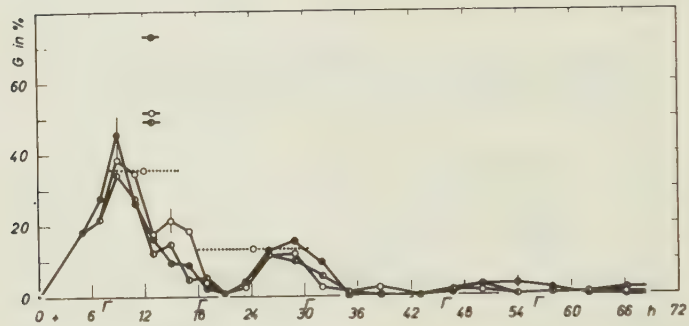


Abb. 30. Der Einfluß einer 1-stündigen Vorverdunkelung auf die sexuelle Aktivität von DL-Kulturen, untersucht nach Überführung ins DD und gleichzeitigem Suspendieren. Abszisse: Zellzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G. Angegebene Fehler = $\pm \sigma$-Bereich. Versuche an ♀ (25-d-Kulturen) mit Inkubationszeiten von 2...4 h.

o: Überführung ins DD und Suspendieren gleichzeitig. 2 Langzeitinkubationen gepunktet eingetragen.

●: Wie o, jedoch von Z = -24...-23 h dunkel gehalten.

◐: Wie o, jedoch von Z = -12...-11 h dunkel gehalten. Testklone: ♀, 34...37-d-Kulturen aus phasenverschobenen 14 h:10 h und 12 h:12 h Anzuchtrhythmen in 3,7...10,6-facher Konzentration zu ♀ angewendet. ⌜ = ♀-Wechsel.

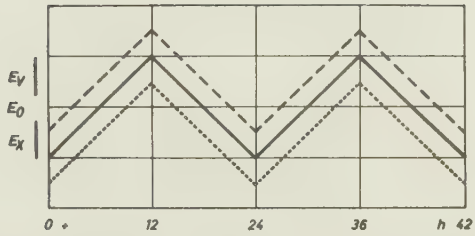


Abb. 31. Schematische Darstellung zur Erklärung der Steuerung der sexuellen Aktivität durch den Oscillator. Abszisse: Zeitzeit in h (s. III 9). Ordinate: Energielage des Oscillators. E_V-Bereich in dem die Bildung einer für die sexuelle Aktivierung notwendigen Vorstufe V erfolgt; E_X-Bereich, in dem die Synthese der sexuellen Affinität unter Verbrauch von V abläuft. Im Normalfall (ausgezogen) werden der E_V- und E_X-Bereich täglich einmal ganz durchlaufen, d. h. es treten normale Gametenmaxima auf. Wenn der Oscillator um hohe Energielagen schwingt (gestrichelt), wird der E_X-Bereich nur angeschnitten, d. h. es treten geschärfte Gametenmaxima auf. Bei Schwingen um niedere Energielagen (gepunktet) wird der E_X-Bereich zweimal ganz durchlaufen, d. h. es treten Aufspaltungen der Gametenmaxima auf, wobei die Nebenmaxima notwendig kleiner sind, da inzwischen keine Nachbildung von V erfolgt ist.

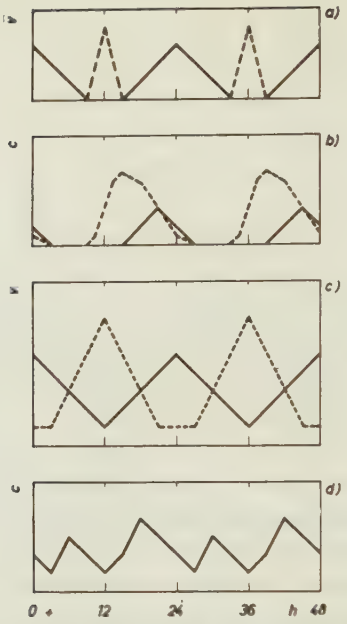


Abb. 32. Schematische Darstellung zur Erklärung des Auftretens von Gameten-Haupt- und Nebenmaxima. Abszissen: Zeitzeit in h. Ordinaten: Durchflußgeschwindigkeiten v bzw. Konzentrationen c. Durch die endogene Tagesrhythmik gesteuert, schwanken die Durchflußgeschwindigkeiten v an den Stellen a (gestrichelt) und b (ausgezogen) in der Synthesekette von X tagesperiodisch (vgl. Gl. (19')) gegeneinander phasenverschoben wie in a) angegeben. Dies führt zu einer Anhäufung von V (gestrichelt) im Bereich der Nachtstunden (s. b)). In den Morgenstunden, mit Ansteigen des Durchflusses an der Stelle b)wird V in das die Paarung kontrollierende Substrat X (ausgezogen) umgebaut und es treten für einige Stunden Dunkelgameten auf. Dabei wird V weitgehend aufgebraucht. Durch weißes Licht wird der Durchfluß bei a und b grundsätzlich beschleunigt (s. c)). Prüft man die Lichtaktivierbarkeit über den Tagesverlauf, so treten daher die in d) dargestellten Konzentrationsschwankungen von X auf. Sie setzen sich zusammen aus dem in b) angegebenen Tagesverlauf von X im Dunkeln und der jeweils bei Belichtung erzielten Ausbeute an X, die durch die untere Begrenzungslinie von v_a und v_b in c) gegeben wird.

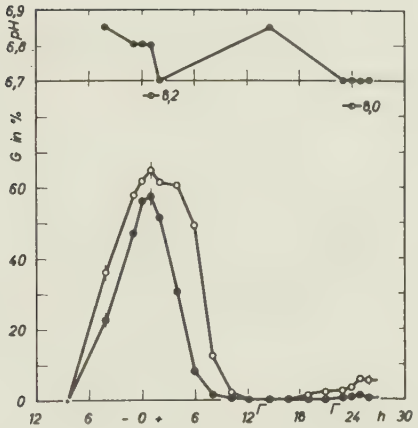


Abb. 33. Sexuelle Aktivierung durch gelbe Strahlung (589 nm) bei ♀-Kulturen aus Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel. Abszisse: Zellzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G (angegebene Fehler = $\pm \sigma$-Bereich), bzw. pH-Wert bei Versuchsende.
●: Versuche an ♀ (36-d-Kultur) mit Inkubationszeiten von 2 h.
o: dito, jedoch vor dem Mischen mit dem Testklon 10 min aktiviert mit 0,026 mm^3 Quanten/min·cm^2 der Wellenlänge λ = 589 nm. Methodik wie XII 2 a beschrieben.
◐: dito, jedoch inkubiert bei 2000 Lux (Osram Wolframfadenlampe Linestra, 30 W).
Testklone: ♀ (36...37-d-Kulturen), aus phasenverschobenen 14 h: 10 h L:D-Wechseln in 2,0...2,1-facher Konzentration zu ♀ angewendet. ⌜ = ♀-Wechsel.

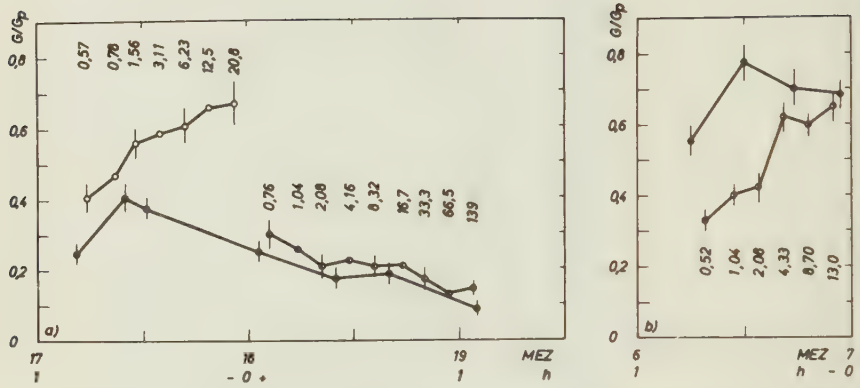


Abb. 34. Der Einfluß verschiedenfarbigen Lichtes auf die sexuelle Aktivität von ♀ nach Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel, geprüft im Bereich Z = -1...+1 h. Abszisse: MEZ in h bzw. Zeitzeit Z in Ordinate: Paarungsrate G/G_p. Angegebene Fehler = $\pm \sigma$ -Bereich.

a) ♀, 32-d-Kultur.

●: Dunkelgametentiter G_d/G_p.

o: Gametentiter G/G_p nach Bestrahlung mit der angegebenen Dosis D in mm^3 Quanten der Wellenlänge λ = 589 nm.

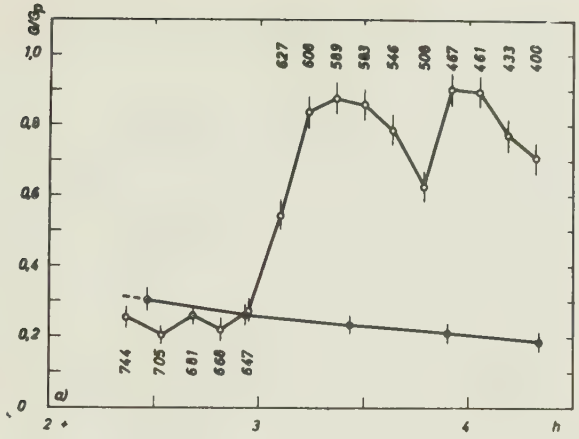
◐: dito für λ = 705 nm.

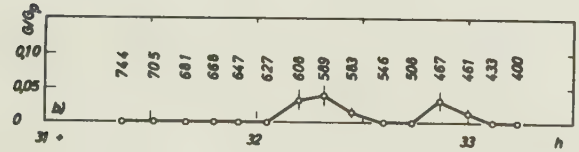
b) ♀, 36-d-Kultur.

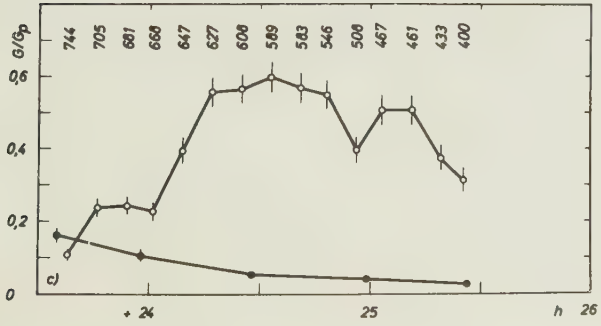
●: Wie bei a) ●.

◑: Wie bei a) o, jedoch für λ = 744 nm.

Testklone: ♀, 34 bzw. 36-d-Kulturen aus gleicher Anzuchtrhythmik wie ♀.


G/Gp
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
627 608 589 583 546 506 467 461 433 400
744 705 681 668 647
a)
2 +
3
4
h


G/Gp
0,10
0,05
0
744 705 681 668 647 627 608 589 583 546 506 467 461 433 400
b)
31 +
32
33
h


G/Gp
0,6
0,4
0,2
0
744 705 681 668 647 627 608 589 583 546 506 467 461 433 400
c)
+ 24
25
h
26

b. w.

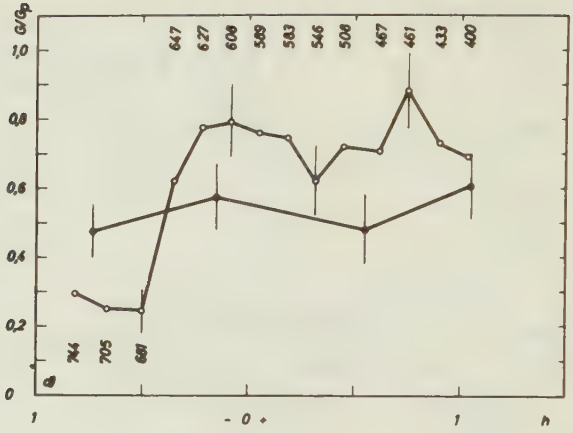


Abb. 35. Die Beeinflussung der sexuellen Aktivität von ♀ und ♂ aus Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel durch Strahlung verschiedener Spektralbereiche. Geprüft zu verschiedenen Zellzeiten bei Einstrahlung einer konstanten Dosis D = N·t = 1,04 mm^3 Quanten/min·5 min = 5,2 mm^3 Quanten bei allen Wellenlängen λ. Abszisse: Zellzeit Z in h. Ordinate: Paarungsrate G/G_p. Angegebene Fehler $\pm \sigma$-Bereich. Zu jedem Meßpunkt ist die Wellenlänge λ in nm angegeben.

a) Versuche an ♀, 35-d-Kultur mit ♀, 35-d-Kultur als Testklon.
●: Dunkelgametentiter G_d/G_p. o: Gametentiter G_λ/G_p nach Bestrahlung mit den angegebenen Wellenlängen. G_p = 0,80.

b) ♀ wie unter a) mit ♀, 36-d-Kultur als Testklon. Dunkelgametentiter G_d/G_p im Untersuchungsbereich konstant = 0.
o: Wie unter a). G_p = 0,64.

c) Versuche an ♀, 38-d-Kultur mit ♀, 34-d-Kultur als Testklon.
●: Wie unter a). o: Wie unter a). G_p = 0,89.

d) Versuche an ♂, 24-d-Kultur mit ♀, 24-d-Kultur als Testklon.
●: Wie unter a). o: Wie unter a). G_p = 0,57.

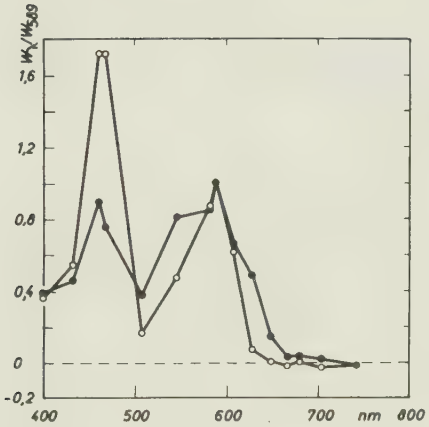


Abb. 36. Provisorische Wirkungsspektren für den Einfluß sichtbarer Strahlung auf die sexuelle Aktivität von ♀ und ♂, berechnet nach den Versuchen der Abb. 35 a (o) und c (●). Abszisse: Wellenlänge λ in nm. Ordinate: Verhältnis der Wirkungsstärken W_λ/W_{589} bezogen auf die Wirkungsstärke der Bezugswellenlänge λ_0 = 589 nm, berechnet nach Gleichung (31).

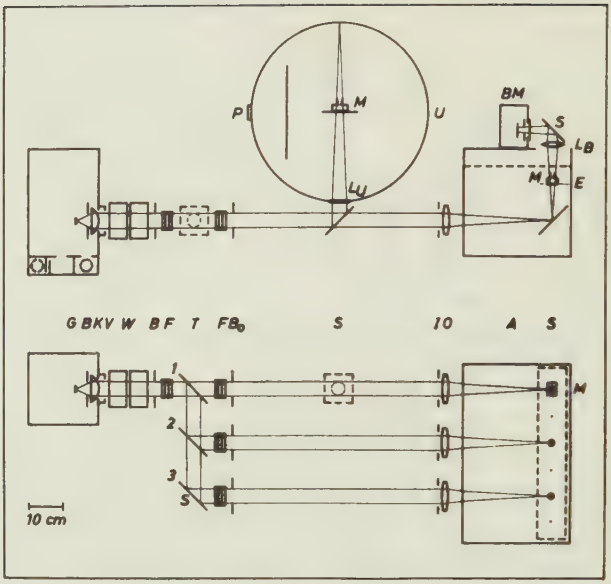


Abb. 37. Schematische Darstellung der Interferenzfilter-Monochromator-Anlage für Versuche in manometrischer Anordnung und der Anordnung der ULBRICHT'schen Kugel. A: Wasserthermostat (entsalztes Wasser!); B, B_0: Kreisblenden (4 cm ø); BM: Bolometer; E: Ebene, in der B_0 abgebildet wird; F: Filterhalter; G: Glühlampenwendel; I: Irisblenden; K: Kondensorlinse ($f \approx 5$ cm); L_B: Sammellinse ($f \approx 8$ cm); L_U: Sammellinse ($f \approx 50$ cm); M: Manometriegefäße; O: Objektivlinsen ($f \approx 20$ cm); P: Photozelle; S: Spiegel; T: teildurchlässige Spiegel; U: ULBRICHT'sche Kugel; V: Verschluß; W: Wasserküvetten (aqua bidest.).

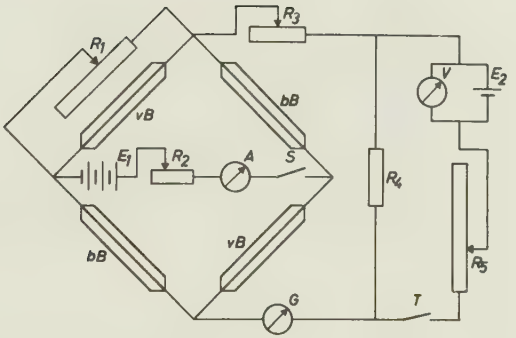


Abb. 38: Schaltung des Bolometers. vB: verdunkelte Bolometerzweige; bB: bestrahlbare Bolometerzweige (je Zweig $\approx 100\Omega$). E_1: Brückenakkumulator (6 V, 16 Ah). E_2: Kompensationsakkumulator (2 V, 24 Ah). R_1: Regelwiderstand ($\approx 2000\Omega$) zur Kompensation des Dunkelstroms in der Brücke. R_2: Regelwiderstand ($\approx 80\Omega$) zum Einregeln eines Stromes von 60,0 mA. R_3: Regelwiderstand (0...10 000Ω) als Schutzwiderstand und zur Empfindlichkeitsregulierung des Galvanometers G. R_4: Festwiderstand (= 0,1Ω). R_5: Kompensationswiderstand (regelbar von 0...200 000 Ω, in Stufen von 0,1Ω). A: Präzisions-Amperemeter (GOSSEN, 75 mA). G: ZERNIKE-Galvanometer (KIPP & ZONEN, Type Z b, Innenwiderstand 35Ω, kritisch dämpfbar für Außenwiderstände von 1...200Ω; 1 mm Abweichung bei 1 m Lichtweg wird erzielt durch $(3...1,2)\cdot 10^{-9}$ A). V: Präzisions-Voltmeter (SIEMENS, Multizet). S: Schalter. T: Taster. Alle Widerstände sind Manganin-Präzisions-Widerstände der Fa. WOLFF. Die Verdrahtung (Kupfer) wurde so kurz wie möglich gestaltet. Die Zuleitungen zum Bolometer und Galvanometer wurden abgeschirmt.

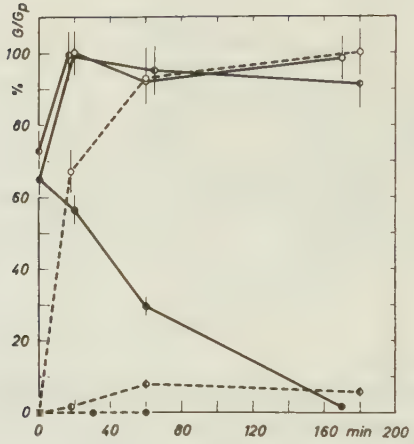
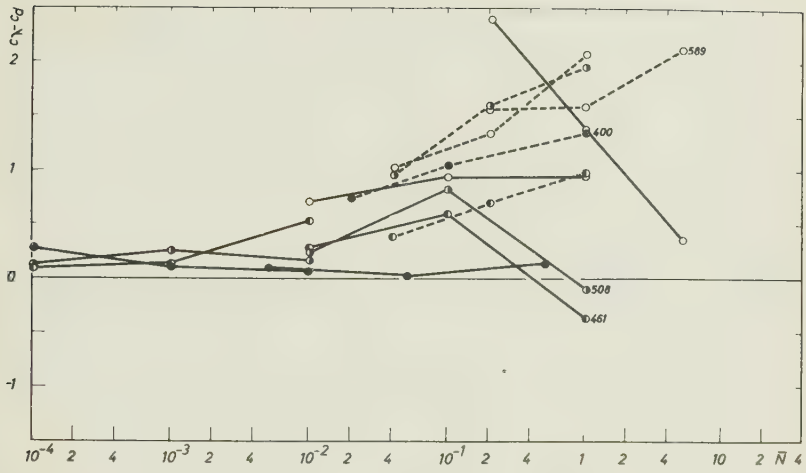
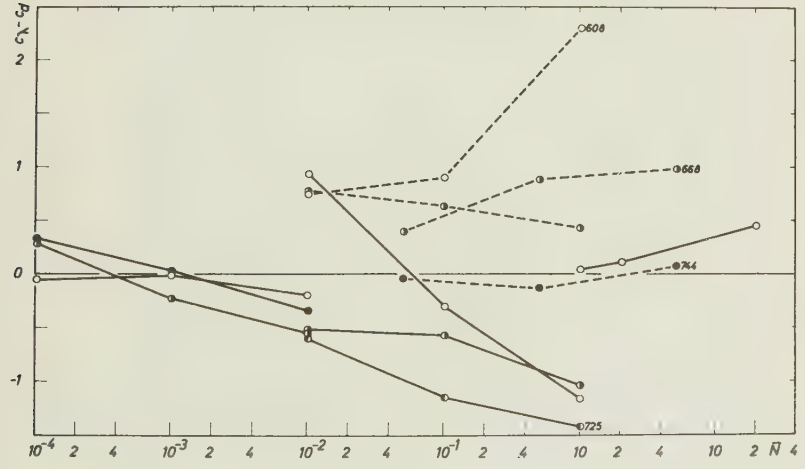


Abb. 39. Dosis-Effekt-Kurven für die Beeinflussung der sexuellen Aktivität von im 14 h:10 h L:D-Wechsel angezüchteten ♀ (26...34-d-Kulturen) durch verschieden farbiges Licht, bestimmt in manometrischer Anordnung bei konstanter Intensität und variierter Expositionszeit. Abszisse: Dauer der Vorbelichtung t in min. Ordinate: Paarungsrate G/G_p. Angegebene Fehler: $\pm \sigma$-Bereich.
o: Versuche mit weißem Licht (HNW) und einer Beleuchtungsstärke E = 1100 Lux. Ausgezogene Kurve: Der Zeitpunkt M, bei dem die Test-♀ eingekippt wurden und die Belichtung beendet war, liegt bei Z = 0 h. Gestrichelte Kurve: M = + 13 h.
●: Versuche mit Strahlung der Wellenlänge λ = 589 nm, und einem mittleren Quantenstrom $\bar{N}$ = 0,26 mm^3 Quanten/min. Ausgezogene Kurve: M = 0 h. Gestrichelte Kurve: M = + 13 h.
●: Versuche mit λ = 744 nm. Ausgezogene Kurve: $\bar{N}$ = 0,42 mm^3 Quanten/min und M = 0 h. Gestrichelte Kurve: $\bar{N}$ = 10,4 mm^3 Quanten/min und M = + 11,25 h.


$p_2 - x_2$
2
1
0
-1
589
400
508
461
10^{-4} 2 4 10^{-3} 2 4 10^{-2} 2 4 10^{-1} 2 4 1 2 4 10 2 $\bar{N}$ 4

a)

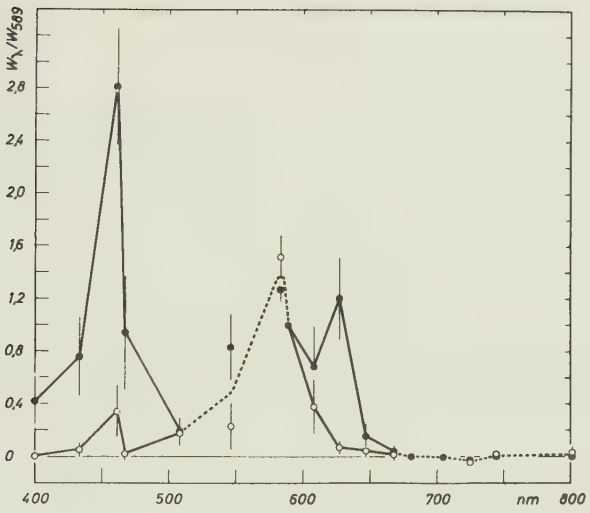

$p_2 - x_2$
2
1
0
-1
608
668
744
725
10^{-4} 2 4 10^{-3} 2 4 10^{-2} 2 4 10^{-1} 2 4 10 2 4 10 2 $\bar{N}$ 4

b)

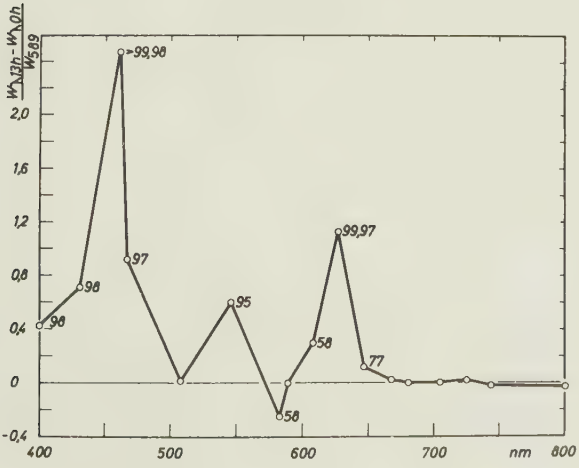
b. w.

Abb. 40. Dosis-Effekt-Kurven für die Beeinflussung der sexuellen Aktivität von im 14 h:10 h L:D-Wechsel angezüchteten ♀ (20...30-d-Kulturen) durch Licht verschiedener Wellenlängen, bestimmt in manometrischer Anordnung bei konstanter Expositionszeit und variierter Intensität. Abszisse: Quantenstrom $\bar{N}$ in mm^3 Quanten/min logarithmisch. Ordinate: Als Maß für die Wirkung des Lichtes ist der erzielte Konzentrationsunterschied der Kontrollsubstrates X der Paarung, $c_\lambda - c_d$ in a-Einheiten, berechnet nach Gl. (26) aufgetragen. Werte, die gleichzeitig am gleichen Material gewonnen sind, sind verbunden. Für jeden Kurvenast ist angegeben: Die Wellenlänge λ in nm; der Zeitpunkt, bei dem die Belichtung beendet und die Test-♀ eingekippt worden sind als M in Zellzeit; der Dunkelgametentiter G_d/G_p.

Abb.	Zeichen	λ(nm)	ausgezogen		gestrichelt	
			M (h)	G_d/G_p	M (h)	G_d/G_p
a)	●	400	+0,3 +0,3	0,45 0,66	+13,3	0,002
	◐	461	+0,2 +0,3	0,41 0,60	+13,0	0,004
	◑	508	+0,2 0	0,36 0,81	+13,0	0,004
	○	589	+0,4 -0,5	0,15 0,75	+13,0 +13,0	0,013 0,24
b)	○	608	+0,3 0 -0,3	0,69 0,86 0,70	+ 2,0	0,046
	◑	668	+0,1 +0,5	0,80 0,85	+0,9 +13,0	0,39 0,006
	◐	725	+0,2	0,91		
	●	744	+0,3	0,34	+13,0	0,042


W_λ / W_{569}
2,8
2,4
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0
400
500
600
700
nm
800

a)


$\frac{W_{\lambda 2h} - W_{\lambda 0h}}{W_{569}}$
>99,98
99,97
98
98
97
95
58
58
77
2,0
1,6
1,2
0,8
0,4
0
-0,4
400
500
600
700
nm
800

b)

b. w

Abb. 41. Wirkungsspektren für die Beeinflussung der sexuellen Aktivität von im 14 h:10 h L:D-Wechsel angezüchteten ♀ durch sichtbare Strahlung.
a.) Abszisse: Wellenlänge λ in nm. Ordinate: Wirkungsstärke W_λ bezogen auf die Wirkungsstärke von λ_o = 589 nm. Angegebene Fehler = $\pm\ \sigma$ -Bereich.
o: Aufgenommen in manometrischer Anordnung bei einem mittleren Quantenstrom $\bar{N}$ = 0,01 mm^3 Quanten/min und einer Expositionszeit von t = 30 min ab Z = -0,3...+0,3 h, d. h. im Bereich des ersten erwarteten Tagbeginns nach dem Suspendieren. Die Test-♀ wurden bei Belichtungsende eingekippt.
●: dito, jedoch $\bar{N}$ = 0,52 mm^3 Quanten/min ab Z = +13,0...+13,5 h.
b) Das Differenzspektrum. Es sind die zwischen beiden Wirkungsspektren auftretenden Wirkungsstärkendifferenzen $(W_{\lambda\ 0\ h} - W_{\lambda\ 13\ h})/W_{\lambda}$ gegen die Wellenlänge λ aufgetragen. Der Grad der Sicherung ist in Form der P-Werte als Prozente angegeben.

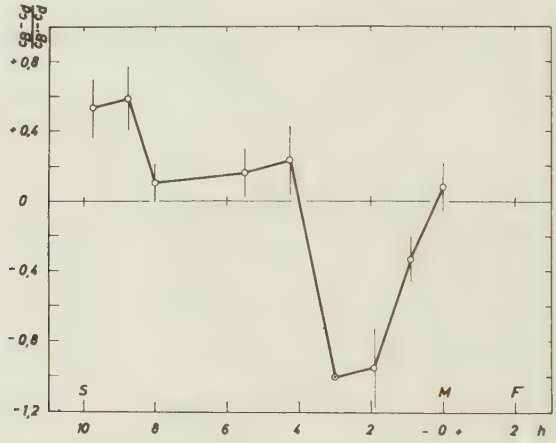


Abb. 42. Der Einfluß einer zu verschiedenen Zeiten vor dem erwarteten Tagbeginn gegebenen Dosis dunkelroter Strahlung auf den Gametentiter z. Zt. des erwarteten Tagbeginns. Objekt: ♀, 25...32-d-Kulturen aus 14 h:10 h L:D-Wechsel. λ = 744 nm, $\bar{N}$ = 1,04 mm^3 Quanten/min, t = 60 min, also $\bar{D}$ = 62,4 mm^3 Quanten. Zeitpunkt, bei dem die ♀ eingekippt wurden: E = 0,0 h. Fixiert um F =+2,0 h. Abszisse: Zeitpunkt B in Zellzeit, bei dem die Belichtung begann. Ordinate: Verhältnis der erzielten Konzentrationsunterschiede des Kontrollsubstrates X, berechnet nach Gl. (52), bezogen auf B = -3,0 h. Angegebene Fehler = $\pm\ \sigma$ -Bereich.

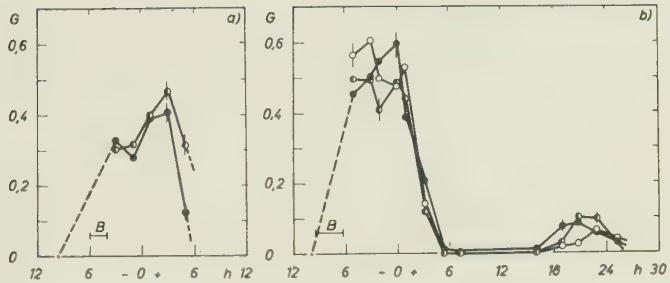


Abb. 43. Phasenverschiebung der Rhythmik durch Störlicht. Abszisse: Zellzeit Z in h. Ordinate: absolute Paarungsrate G. Angegebene Fehler = $\pm\sigma$-Bereich.
a) Versuche an ♀, 28-d-Kultur aus 14 h:10 h L:D-Wechsel.
●: Dunkelkontrolle. ◐: Von Z = -6,0...-4,0 h bestrahlt mit einer mittleren Intensität $\bar{I}$ = 0,052 mm^3 Quanten/cm^2·min der Wellenlänge λ = 744 nm.
b) Wie a). ●: Dunkelkontrolle. o: Von Z = -9,5...-6,5 h bestrahlt mit einer mittleren Intensität $\bar{I}$ = 0,26 mm^3 Quanten/cm^2·min der Wellenlänge λ = 647 nm.
◐: Wie o, jedoch bestrahlt mit $\bar{I}$ = 0,012 mm^3 Quanten/cm^2·min von λ = 744 nm.
Testklone: ♀, angewendet wie bei Abb. 21.

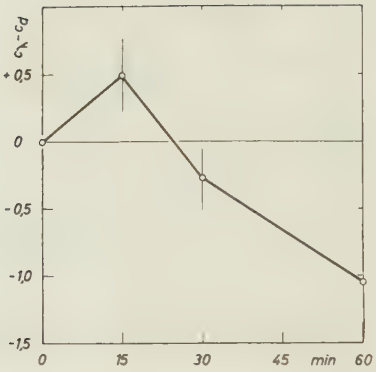


Abb. 44. Dosis-Effekt-Kurve für den Einfluß von dunkelrotem Störlicht auf die sexuelle Aktivität von ♀ (25...32-d-Kulturen aus 14 h:10 h L:D-Wechsel), bestimmt in manometrischer Anordnung bei konstantem Quantenstrom und variierter Expositionszeit. Abszisse: Expositionszeit t in min. Ordinate: erzielter Konzentrationsunterschied des Kontrollsubstrates X in a-Einheiten, berechnet nach Gl. (26). Angegebene Fehler = $\pm \sigma$ -Bereich. λ = 744 $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min; B = -3,0 h; M = 0 h; F = +2 h. Testklon: ♀.

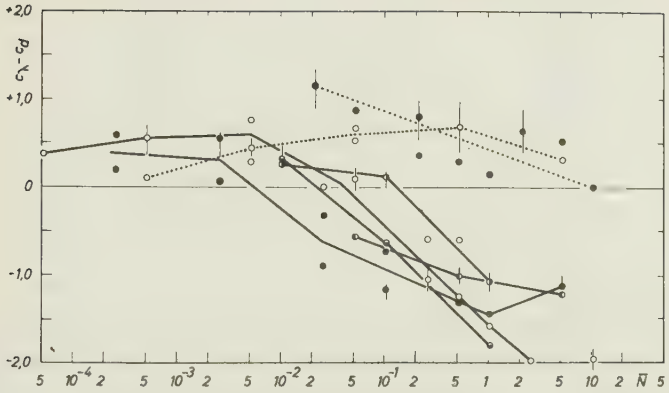


Abb. 45. Dosis-Effekt-Kurven für den Einfluß von Störlicht auf die sexuelle Aktivität von ♀ (25...35-d-Kulturen aus 14 h:10 h L:D-Wechsel), bestimmt in manometrischer Anordnung bei konstanter Expositionszeit und variiertem Quantenstrom. Abszisse: mittlerer Quantenstrom $\bar{N}$ des Störlichtes in mm^3 Quanten/min, logarithmisch aufgetragen. Ordinate: Erzielter Konzentrationsunterschied des Kontrollsubstrates X in a-Einheiten, berechnet nach Gl. (26). Angegebene Fehler: $\pm\sigma$ -Bereich, t = 60 min; M = -1,0 h; F = +1,5 h; G_d/G_p = 0,38...0,85; Testklon: ♀.

●——●: Versuche mit λ = 461 nm und B = -3,0 h.
●——●: λ = 508 nm, B = -3,0 h.
○——○: λ = 589 nm, B = -3,0 h.
○...○: λ = 589 nm, B = -6,0 h.
◐——◐: λ = 668 nm, B = -3,0 h.
●——●: λ = 745 nm, B = -3,0 h.
●...●: λ = 745 nm, B = -6,0 h.

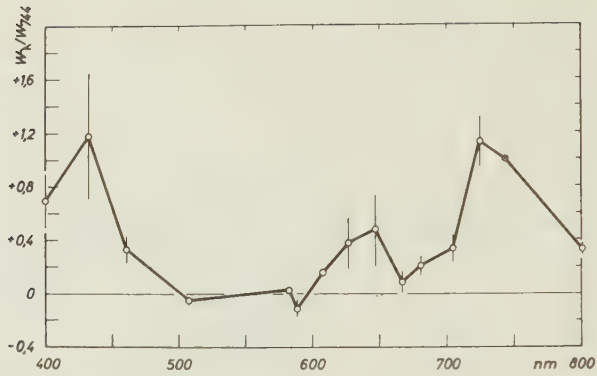


Abb. 46. Das Wirkungsspektrum für die Hemmung der sexuellen Aktivität von ♀ durch Störlicht (NER). Ab B = -3,0 h wurde bei jeder Wellenlänge t = 30 min lang mit einem konstanten mittleren Quantenstrom $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min bestrahlt. Die Test-♀ wurden bei M = -1,0 h eingekippt. Fixiert wurde z. Zt. F = +1,0 h bei allen Versuchen lag der Dunkelgametentiter von ♀ im Bereich G_d/G_p = 0,59...0,93. Abszisse: Wellenlänge λ in nm. Ordinate: Wirkungsstärke bezogen auf die Wirkung bei λ_o = 744 nm, berechnet nach Gl. (30'). Angegebene Fehler: $\pm \sigma$ -Bereich.

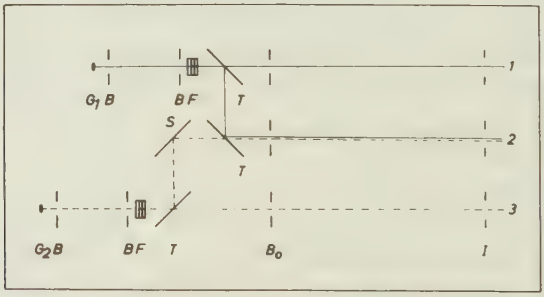


Abb. 47. Optische Versuchsanordnung (schematisch) zur Erzeugung von "Mischlicht" aus monochromatischer Strahlung. Bezeichnungen wie in Abb. 37.

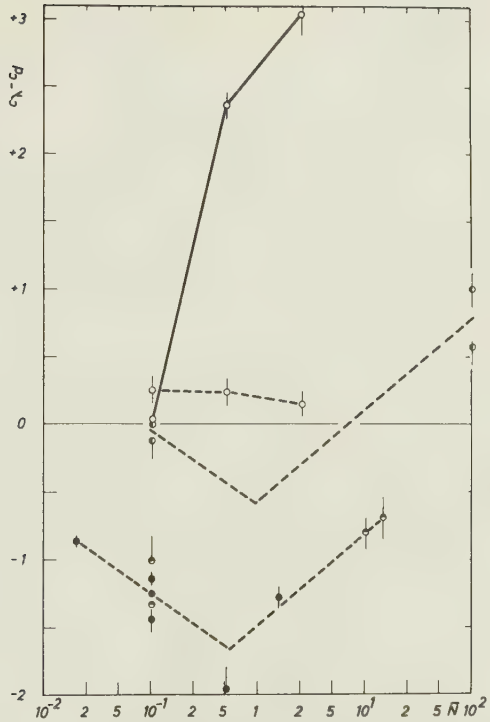


Abb. 48. Nachweis der HER bei ♀ (24...33-d-Kulturen aus 14 h:10 h L:D-Wechsel). Bezeichnungen wir in Abb. 45. Der Zeitpunkt des Störlichtbeginns lag für λ = 744 nm (●), 745 nm (●) und λ = 700...800 nm (●) bei B = −4,0 h, die Expositionsdauer betrug t = 300 min; die Test-♀ wurden z. Zt. M =−1,0 h eingekippt; fixiert wurde umF = +1,0 h; der Dunkelgametentiter lag im Bereich G_d/G_p= 0,20...0,85; angegebene Fehler = $\pm\sigma$ -Bereich. Die Werte mit λ = 589 nm (o) sind am gleichen Material gewonnen; es war B = −4,0 h (gestrichelt) bzw. = +8,0 h (ausgezogen); M = −1,0 h bzw. +11,0 h; F = + 1,0 h bzw. +13,0 h; G_d/G_p= 0,23 bzw. 0,002.

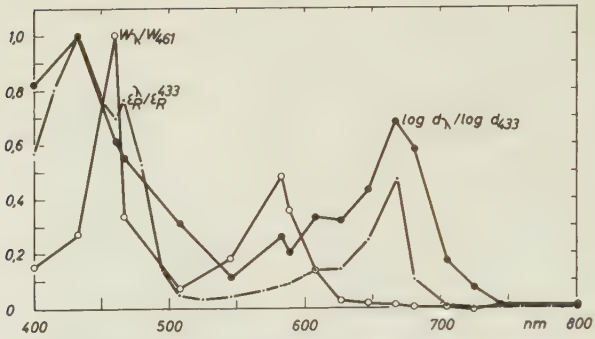


Abb. 49. o—o: Wirkungsspektrum für die über das "Blau-Gelb-Pigment" induzierte sexuelle Aktivierung von ♀, bezogen auf λ = 461 nm.
●—●: Absorptionsspektrum lebender ♀ (20...35-d-Kulturen), bezogen auf λ = 433 nm, aufgenommen in der ULBRICHT'schen Kugel mit 3 mm^3 Zellen/3 cm^3 bei einer Gefäßbodenfläche F = 8,5 cm^2, d. h. bei einer Flächenbelegung von $0{,}35 \cdot 10^{-3}$ cm^3 Zellen/cm^2.
·—·: Absorptionsspektrum des Methanolextraktes von ♀, bezogen auf λ = 433 nm. Abszisse: Wellenlängen in nm.

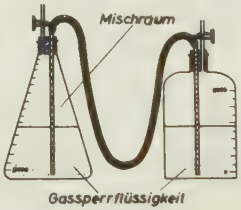


Abb. 50. Gasgemischaggregat. Bestehend aus einem Erlenmeyerkolben und einer Steilbrustflasche (jeweils 5 l). Beide Flaschen sind mit einer Volumenskala (gegenläufig!) versehen und über Steigrohre mit einem Schlauch verbunden. Als Gassperrflüssigkeit dient eine 20 %ige Lösung von Na_2SO_4 in 5 %iger H_2SO_4. Beim Einfüllen der Gase ist darauf zu achten, daß sich die gewünschte Volumenendmarke bei beiden Flaschen in gleicher Höhe befindet und das Endvolumen jeweils "druckfrei" erreicht wird. Mischungen bis zum Verhältnis 0,5/99,5 können mit einer relativen Genauigkeit von etwa ± 5 % hergestellt werden, sofern das in geringerer Menge vorhandene Gas als erstes in den Mischraum gegeben wird und auf ein Endvolumen von 5 l gemischt wird.

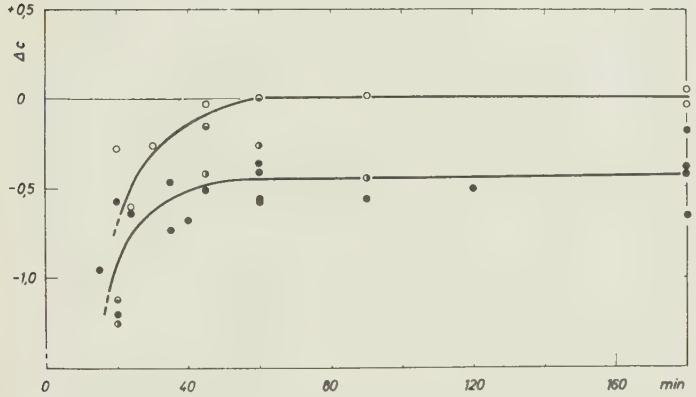


Abb. 51. Das Einspielen des Gametentiters bei ♀ in einer Atmosphäre mit 1 bzw. 20 Vol.-% Sauerstoff nach vorhergehendem 20-minutigem Aufenthalt in Argon. Abszisse: Zeitspanne t zwischen dem Einleiten der sauerstoffhaltigen Atmosphäre und dem Fixieren in Minuten. Ordinate: Erfaßter Konzentrationsunterschied Δc des Kontrollsubstrates X in a-Einheiten, berechnet nach Gleichung (59). Versuche an Dunkelgameten durchgeführt ab Z = - 2 h, ●: bei 1 Vol.-% Sauerstoff, o: bei 20 Vol.-% Sauerstoff. Versuche an lichtinduzierten Gameten (100 Lux von HNW 120) durchgeführt ab Z = + 12 h, ◐: bei 1 Vol.-% Sauerstoff, ◉: bei 20 Vol.-% Sauerstoff. Testklon: ♀.

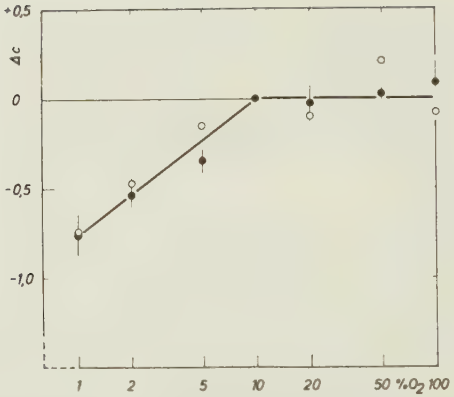
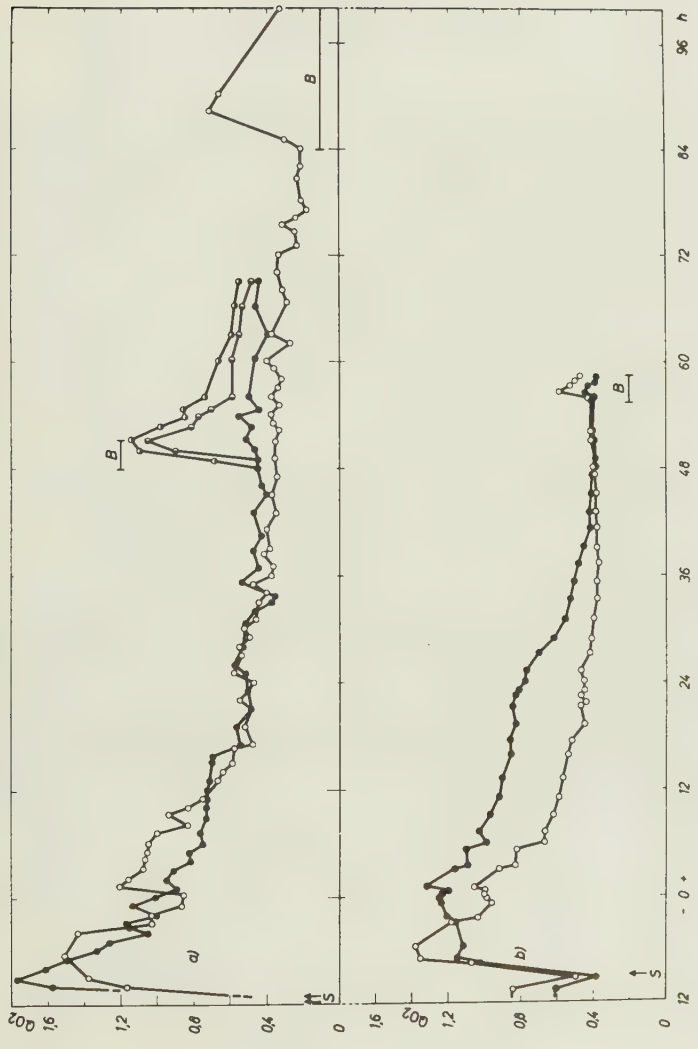


Abb. 52. Einspielen des Gametentiters bei ♀ und ♂ in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck nach vorhergehendem 20-minutigem Aufenthalt in Argon. Abszisse: Vol.-% Sauerstoff in der Atmosphäre, logarithmisch aufgetragen. Ordinate: Erzielter Konzentrationsunterschied Δ c des Kontrollsubstrates X in a-Einheiten, berechnet nach Gleichung (59'). Versuche mit ♀ als Testklon, bestimmt bei M = 0 h und F = + 2 h, ●: an ♀, Mittel aus 4...5 Messungen, mittlere quadratische Abweichung s ist angegeben; o: bestimmt an ♂, Mittel aus 2 Messungen.



b.w.

Abb. 53. Atmungsgröße im Dunkeln und das Phänomen der lichtinduzierten Atmung, gemessen in manometrischer Anordnung mit Kalilauge als CO_2-Absorbens. Ordinate: Q_{O_2} in mm^3 O_2/mm^3 Zellen·h. Abszisse: Zellzeit in h; S = Suspendierzeitpunkt. B = Belichtungszeitraum. a)Versuche an ♂. o: 25 d-Kultur, Anzucht im 12 h:12 h L:D-Wechsel; 24 mm^3 Zellen/3 cm^3; $k_{O_2\ Brodie}$ = 1,055; B = 500 erg/cm^2·sec von HNI; angegebener Kurvenverlauf entspricht dem Mittel aus zwei Messungen.
●: 27 d-Kultur, Anzucht im 12 h:12 h L:D-Wechsel; 24 mm^3 Zellen/3 cm^3; $k_{O_2\ Brodie}$ = 1,05.
◐: B = 460 erg/sec = 0,3 mm^3 Quanten/min bzw. ◒: B = 4600 erg/sec 3,0 mm^3 Quanten/min bei λ = 589 nm; angegebener Kurvenverlauf bis Z=+ 48 h = Mittel aus drei Messungen, ab Z = + 48 h Einzelmessungen.
b) Versuche an ♀ und ⚲. ●: ♀, 32 d-Kultur, Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel; 54 mm^3 Zellen palmelloid bzw. pro 3,05 cm^3; $k_{O_2\ Oktan}$ 1,18 bzw. 0,98; B = 500 erg/cm^2·sec von HNI; angegebener Kurvenverlauf = Einzelmessungen.
o: ⚲, 36 d-Kultur, Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel; 42 mm^3 Zellen palmelloid bzw. pro 3,04 cm^3; $k_{O_2\ Oktan}$ = 1,10 bzw. 0,90; B = 500 erg/ cm^2·sec von HNI.

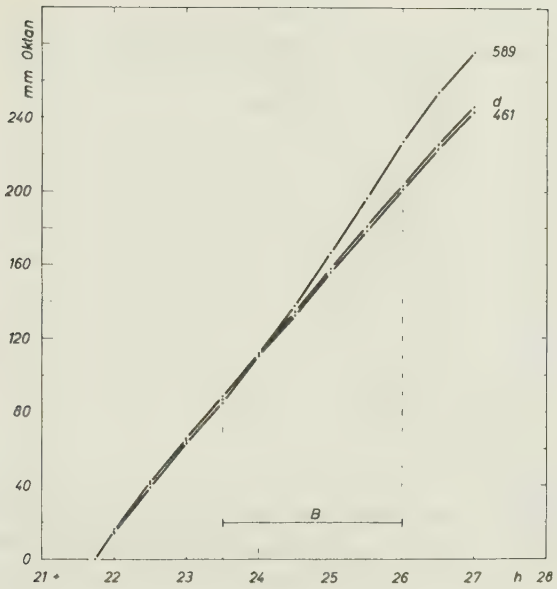


Abb. 54. Lichtinduzierte Atmung bei ♂. 23-d-Kultur, Anzucht im 12 h:12 h L:D-Wechsel. Abszisse: Zellzeit in h. Ordinate: Druckunterschiede in mm Oktan. Im Zeitraum Z = $+21^{15}$...$+21^{30}$ wurde die Zellsuspension (4 cm^3 mit 54 mm^3 Zellen, d_{589}= 0,41, d_{461}= 0,25) in die Manometriegefäße pipettiert und an reine Sauerstoffatmosphäre angeglichen. In Zeitraum B wurde bestrahlt mit einem mittleren Quantenstrom $\bar{N}$ = 0,52 mm^3 Quanten/min und zwar der Ansatz 589 mit der Wellenlänge λ = 589 nm, der Ansatz 461 mit der Wellenlänge λ = 461 nm. Der Ansatz d wurde durchweg dunkel gehalten.

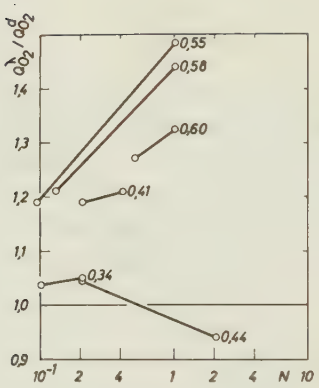


Abb. 55. Der Einfluß von Strahlung der Wellenlänge λ = 589 nm auf den Sauerstoffverbrauch von im 12 h:12 h L:D-Wechsel angezüchteten Φ (25...32-d-Kulturen), gemessen im Bereich Z = +45...+50 h. Abszisse: Eingestrahlter Quantenstrom N in mm^3 Quanten/min. Ordinate:Verhältnis der Atmungsgroßen zwischen Belichtung und Dunkelheit = $Q_{O_2}^{\lambda}/Q_{O_2}^{d}$, berechnet nach Gleichung (65). Die Bestrahlungen wurden alle im Bereich Z = +45...+50 h, also z. Zt. des 3. erwarteten Belichtungsbeginns nach dem Suspendieren durchgeführt. Verbundene Punkte sind gleichzeitig am gleichen Material bestimmt worden. An jedem Ast ist der Durchlaß d_{589} angegeben.

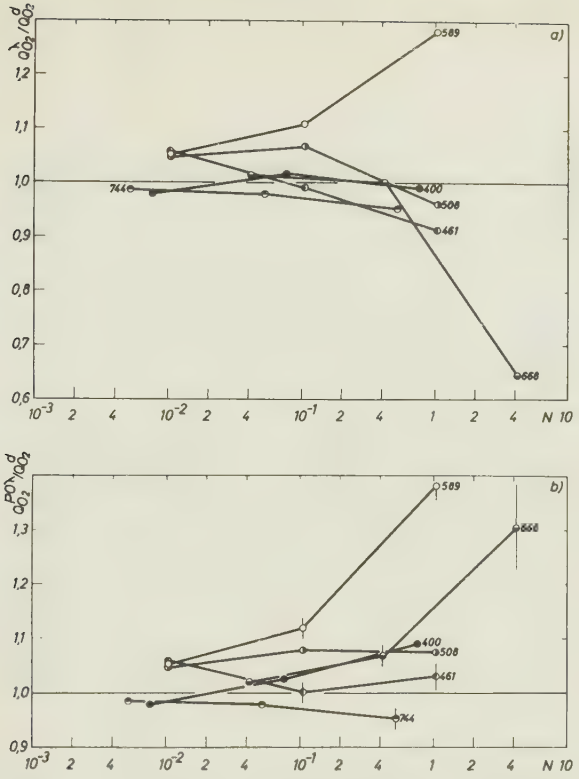


Abb. 56. a) Einfluß von Strahlung verschiedener Wellenlänge auf den Sauerstoffverbrauch von im 12 h:12 h L:D-Wechsel angezüchteten ⊕ (25...30-d-Kulturen), gemessen im Bereich Z = $+12^{00}...+14^{15}$ h. Bezeichnungen wie in Abb. 55.

●: λ = 400 nm, d_{400} = 0,36. ◐: λ = 461 nm, d_{461} = 0,42.
◑: λ = 508 nm, d_{508} = 0,55. ○: λ = 589 nm, d_{589} = 0,68.
◒: λ = 668 nm, d_{668} = 0,23. ◒: λ = 744 nm, d_{744} > 0,99.

b) Ergebnisse von a), korrigiert für den Einfluß der Photosynthese, d. h. Ordinate: $Q_{O_2}^{PO\lambda}/Q_{O_2}^{d}$, berechnet nach Gleichung (69). Sonst wie unter a). Angegebene Fehler entsprechen der mittleren quadratischen Abweichung = ± s.

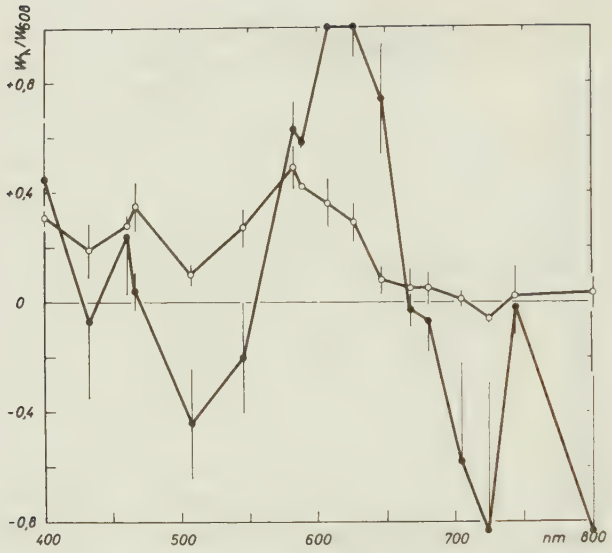


Abb. 57. Vorläufige Wirkungsspektren der lichtinduzierten Atmung, bestimmt an im 12 h:12 h L:D-Wechsel angezüchteten ⊕ (25...35-d-Kulturen). Abszisse: Wellenlänge λ in nm. Ordinate: Relative Wirkungsstärken bezogen an $W_{608} = 1$ für $Z = +12^{00}...+14^{30}$ h. Angegebene Fehler = $\pm$ s bzw. σ.
o: Bestimmt im Bereich Z = +45...+50 h (d. h. z. Zt. des 3. erwarteten Tagbeginns nach dem Suspendieren) bei einem mittleren Quantenstrom $\bar{N}$ = 0,208 mm^3 Quanten/min mit λ_o = 589 nm als Bezugswellenlänge.
●: Bestimmt im Bereich $Z = +12^{00}...+14^{30}$ h (d. h. z. Zt. des 1. erwarteten Nachtbeginns nach dem Suspendieren) bei $\bar{N}$ = 0,104 mm^3 Quanten/min mit λ_o = 608 nm als Bezugswellenlänge.

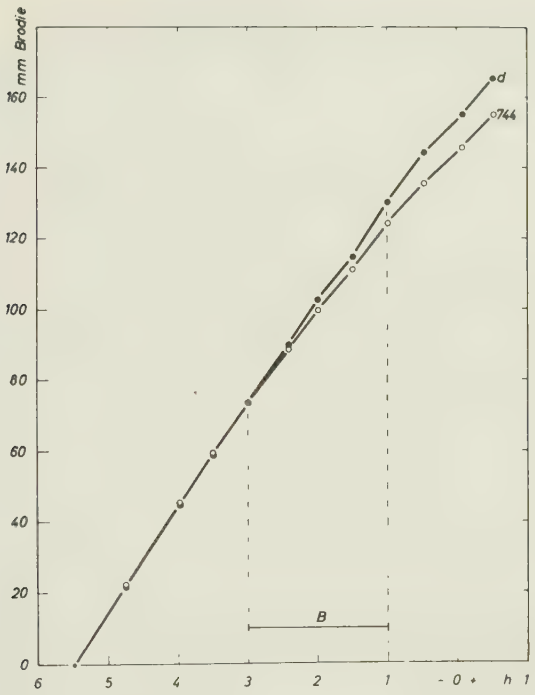


Abb. 58. Atmungshemmung durch Dunkelrot bei Θ, 26-d-Kultur aus Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel. 3 cm^3 Suspension mit 24 mm^3 Zellen; Gasraum: Luft; k_{O_2} = 1,21. Im Zeitraum B wurde mit einem mittleren Quantenstrom $\bar{N}$ = 0,883 mm^3 Quanten/min bei λ = 744 nm bestrahlt. d = Dunkelkontrolle. Abszisse: Zellzeit in h. Ordinate: Druckunterschiede in mm Brodie.

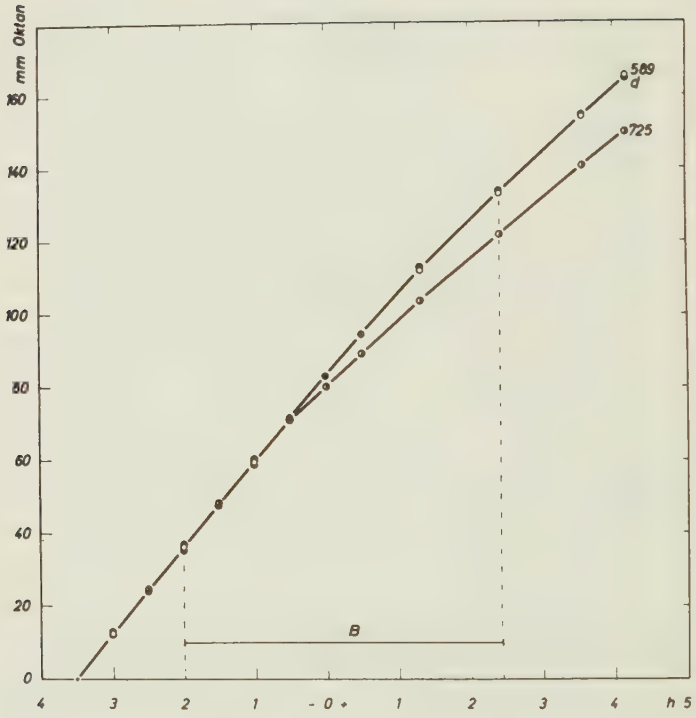


Abb. 59. Atmungshemmung durch Dunkelrot bei ⊖ (30-d-Kultur, 14 h:10 h L:D-Wechsel). 4 cm^3 Suspension mit 32 mm^3 Zellen; Gasraum: Luft; k_{O_2} = 1,43. Im Zeitraum B wurde mit einem mittleren Quantenstrom $\bar{N}$ = 0,204 mm^3 Quanten/min bestrahlt bei der Wellenlänge λ = 589 nm (d_{589} = 0,49) bzw. bei der Wellenlänge λ = 725 nm (d_{725} = 0,95). d = Dunkelkontrolle. Abszisse: Zellzeit in h. Ordinate: Druckunterschiede in mm Oktan.

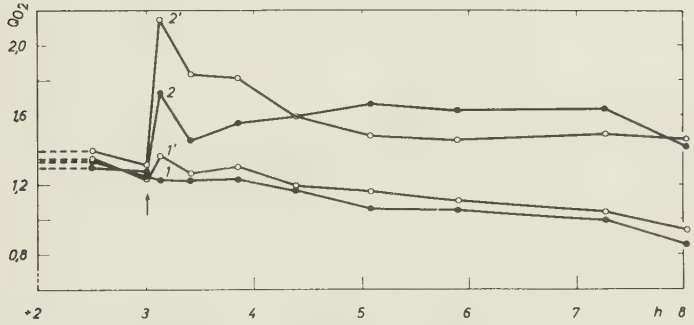


Abb. 60. Der Einfluß von Blausäure auf die Atmung von ♀, 31-d-Kultur aus Anzucht im 14 h:10 h L:D-Wechsel. Abszisse: Zellzeit in h. Ordinate: Atmungsgröße in mm^3 O_2/mm^3 Zellen·h. Um Z = + 3 h wurde eingestellt in: 1 = $2{,}2 \cdot 10^{-4}$ mol KCl; 1' = $1{,}1 \cdot 10^{-3}$ mol KCl; 2 = $2{,}2 \cdot 10^{-4}$ mol KCN; 2' = $1{,}1 \cdot 10^{-3}$ mol KCN. Kastengefäße im Hauptraum: V = 4 mit w = $6 \cdot 10^{-3}$; in der Wanne: 0,3 cm^3 KOH 20 %; Salze in 0,5 cm^3 S gelöst in der Birne; k_{O_2} = 1,01; pH = 7,0...6,8.

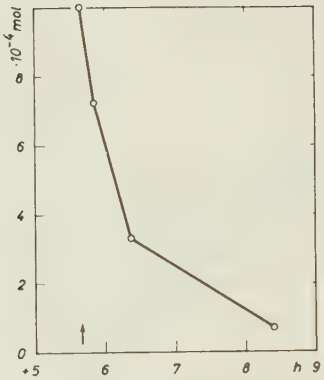


Abb. 61. Cyanidabbau durch ♀, 39-d-Kultur, Anzucht im 12 h:12 h L:D-Wechsel. Abszisse: Zeitzeit in h. Ordinate: molare Konzentration an Cyanid. Gewaschene Zellen wie in VIII a). V = 20; $w = 5 \cdot 10^{-3}$; um $Z = +5^{40}$ h wurden zugegeben 2 cm^3 10^{-2} mol KCN in $S \equiv 10^{-3}$ mol KCN. pH = 7,1 ± 0,1. Cyanidbestimmung: Zellen abgeschleudert (10 min 1000 g) und 5 cm^3 Überstand mit 0,5 cm^3 1 % $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ versetzt. 15 min nach dem Durchschütteln mit Luft (Berliner-Blau-Bildung!) in 1-cm-Küvetten bei 578 nm photometriert (EPPENDORF) gegen 5 cm^3 S mit 0,5 cm^3 Reagens. Eichkurve aufgenommen mit cyanidangereichertem Zellüberstand. Ansätze und Zentrifugation in geschlossenen Gefäßen.

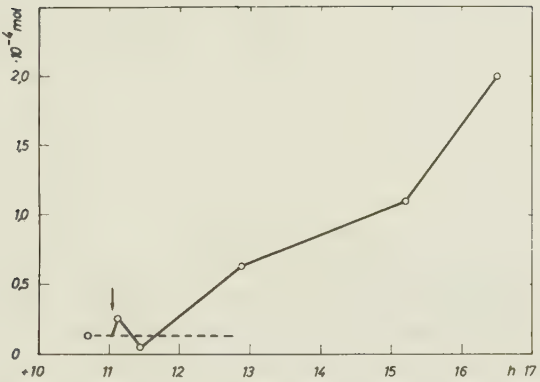


Abb. 62. Das Auftreten von Ammoniumionen im Medium nach Zugabe von Kaliumcyanid. Abszisse: Zeitzeit in h. Ordinate: molare Konzentration an Ammoniumionen. Objekt: ⊖, 35-d-Kulturen, Anzucht im 12 h:12 h L:D-Wechsel, gewaschene Zellen wie unter VIII a) angegeben. V = 25; w = $9 \cdot 10^{-3}$; um Z = $+11^{03}$ h wurde zugegeben 1 cm^3 10^{-2} mol KCN in S ≡ $4 \cdot 10^{-4}$ mol KCN. Gestrichelt: Kontrolle. Ammoniumbestimmung wie in VIII a) angegeben.

Die Arbeit wurde mit Einverständnis von Herrn Prof. Dr. E. BÜNNING angefertigt. Ihm, wie auch den Herren Professoren W. HAUPT, H. MOHR und W. WEIDEL danke ich für anregende Diskussionen. Der Arbeitsplatz wurde mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dr. W. WEIDEL am Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, zur Verfügung gestellt. Hierfür sei vielmals gedankt. Außerdem gebührt mein Dank der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, die die Arbeit apparativ unterstützt hat.

Literatur, die nach dem 31. 12. 61. erschienen ist, konnte nicht mehr berücksichtigt werden.

Lebenslauf

Am 14. Juni 1935 wurde ich als erstes von zwei Kindern des Höhenphysiologen Dr. med. Hans Hartmann und seiner Ehefrau Gertrud (geb. Klein) in Berlin geboren. Mein Vater kam bereits 1937 als Teilnehmer der Deutschen Himalaya-Expedition am Nanga Parbat ums Leben. Ab Herbst 1941 besuchte ich die Grundschule in Würzburg. Im März 1945 wurden wir in Würzburg total bombengeschädigt und übersiedelten ins Westallgäu, wo ich in Weiler die Grundschule beendete. Im Oktober 1945 trat ich in die Oberrealschule Lindenberg im Allgäu ein, an der ich im Juli 1953 die Reifeprüfung ablegte. Dann widmete ich mich an der Universität Tübingen dem Studium der Naturwissenschaften. Vier Semester hörte ich bevorzugt Physik und Mathematik. In der Absicht, mein Physikstudium an einer Technischen Hochschule fortzusetzen, arbeitete ich ein halbes Jahr als Praktikant bei der Fa. Escher-Wyss-Lindau/B.. Unter dem Einfluß meines Großvaters Prof. Dr. Max Hartmann habe ich jedoch dann beschlossen, mich den biologischen Disziplinen zuzuwenden. Dabei bot sich mir zunächst die Möglichkeit, ein Jahr als wissenschaftlich-technische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen; zu arbeiten. Hierbei kam ich erstmals mit dem in der vorliegenden Abhandlung bearbeiteten Problem in Berührung. Meine weiteren Studiensemester verbrachte ich wieder an der Universität Tübingen. Meine akademischen Lehrer waren: Bauer L., Beermann, Brodersen, Bünning, Friedrich-Freksa, Gierer, Grahle, Grell, Hauenschild, Haupt, Heitz, Hillmann, Kamke, Kaudewitz, Knappwost, Kneser, Kossel, Menzel, Möllenstedt, Müller M., Ohlmeyer, Pickert, Reinert, Rüdorff, Schüler, Siedentopf, Tischner, Weidel, Wielandt, Wittig, Zimmermann u.a.. Im Sommer 1958 habe ich am Max-Planck-Institut für Biologie, Abt. Weidel, Tübingen, mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit begonnen. Sie entstand mit Einverständnis von Herrn Prof. Dr. E. Bünning. - Seit Dezember 1956 bin ich verheiratet und habe eine Tochter.

Karl Max Hartmann